

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CELSO FÁVARO JUNIOR

IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES DE SEMAFORINAS CLASSE 5 ATRAVÉS
DO SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO

CURITIBA
2011

CELSO FÁVARO JUNIOR

**IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES DE SEMAFORINAS CLASSE 5
ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Realizado no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre. Sob a orientação da:

Prof.^a Dr.^a Adriana Frohlich Mercadante e
Co-Orientação do Prof.^o Dr.^o Silvio Marques Zanata.

Curitiba
2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Fávaro Junior, Celso

Identificação de ligantes de semaforinas classe 5 através do sistema de duplo-híbrido. / Celso Fávaro Junior. – Curitiba, 2011.

78 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Adriana Frohlich Mercadante

Co-orientador: Silvio Marques Zanata

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Semaforinas. 2. Neurogênese. 3. Biologia molecular. I. Título II. Mercadante, Adriana Frohlich. III. Zanata, Silvio Marques. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.88


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas

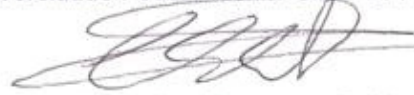
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Christian Macagnan Probst
Instituto Carlos Chagas - ICC

E tendo como suplente,


Prof. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná

Após arguir o mestrando **Celso Favaro junior**, em relação ao seu trabalho intitulado: **"Identificação de ligantes de semaforinas classe 5 através do sistema de duplo-híbrido"** são de parecer favorável à APROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de março de 2011




Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Celso e Bernadeth e aos meus irmãos Elizabete, Guido e Margarete, pelo apoio incondicional; aos meus sobrinhos Mateus, Nicole, Carolina, Gabriela, Fernanda e Marcos, pelo carinho.

Aos meus vários amigos por me apoiarem.

À minha orientadora Prof^a Adriana Mercadante por me acompanhar de perto nessa jornada.

Aos meus colegas e também amigos de laboratório, desde minha época de Iniciação Científica, não só pela ajuda em minha formação científica, mas também por proporcionar um convívio agradável e descontraído.

Em especial agradeço ao também futuro Mestre Breno por dividir boa parte do trabalho e à aluna de Iniciação Científica Evelyn por ajudar em momentos decisivos.

Ao laboratório de Matriz Extracelular pelo apoio.

Aos colegas de outros laboratórios que sempre tinham um reagente chave para emprestar.

À CAPES pela ajuda financeira.

“Há uma teoria que indica que sempre que qualquer um descobrir exatamente o que, para que e porque o universo está aqui, o mesmo desaparecerá e será substituído imediatamente por algo ainda mais bizarro e inexplicável... Há uma outra teoria que indica que isto já aconteceu.”

Douglas N. Adams

RESUMO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os neurônios devem fazer contato correto com alvos específicos que normalmente estão muito afastados. Para isso são necessárias vias sinalizadoras que funcionam como guias no correto direcionamento do cone de crescimento do axônio. Tais vias sinalizadoras são constituídas por moléculas que atraem o axônio para o seu alvo e ao mesmo tempo o repele de vias inapropriadas. Dentre estas moléculas, as semaforinas (Semas) pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, além da participação na progressão tumoral, angiogênese e diferenciação de linfócitos B. As semaforinas de classe 5 são proteínas transmembrânicas, que contém sete repetições trombospondinas. Dois membros dessa família foram identificados em vertebrados, Sema5A e Sema5B. Na literatura há poucos estudos sobre essa classe específica, especialmente sobre Sema5B. Muitas questões sobre esta molécula permanecem em aberto, tais como sua modulação, expressão celular e papéis específicos. O trabalho em questão teve como objetivo identificar ligantes dos domínios citoplasmáticos das Semaforinas 5A e 5B (Sema_5A e Sema_5B), através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Essa metodologia é amplamente utilizada para detectar interações protéicas *in vivo* e será de grande importância para o desenvolvimento de projetos futuros e de colaborações. Fragmentos de DNA contendo as seqüências codificadoras dos domínios citoplasmáticos de Sema5A e Sema5B (Sema_5A e Sema_5B) foram amplificados por PCR, digeridos e inseridos no vetor pGILDA. Estas construções (iscas) foram transformadas em bactérias DH5 α e os plasmídeos obtidos dos clones positivos foram digeridos e seqüenciados para verificação da construção. Os vetores que apresentaram os insertos corretos foram transformados em leveduras da linhagem RFY 206. Vários protocolos de transformação foram utilizados e, após diversas tentativas e dificuldades contornadas, foi possível obter transformantes com as iscas de interesse. Estas foram então checadas quanto ao potencial de auto-ativação e expressão. A isca correspondente ao domínio citoplasmático da Sema5B não foi capaz de auto-ativar os genes-repórteres e em ensaio de Western blotting foi possível ver que o domínio em questão estava sendo expresso nas leveduras. Já a isca referente à Sema5A mostrou ser capaz de auto-ativar os genes-repórteres usados no sistema. Dessa forma, apenas a isca Sema5B foi utilizada para varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório (disponível em nosso laboratório). Nessa varredura foram obtidos 11 clones positivos para interação. Após o sequenciamento dos insertos, 3 candidatos apresentaram insertos com a correta fase aberta de leitura para proteínas que podem ser reais parceiros moleculares de Sema5B: Cript, Scramblase 2 e Trappc6a. Algumas publicações a respeito dessas proteínas mostram que pode haver interações biologicamente relevantes, mostrando que a técnica pode produzir bons resultados. Estes resultados preliminares já indicam um novo caminho a ser tomado.

Palavras-chave: Semaforina, Neurogênese, Sistema de duplo híbrido, Biologia molecular.

ABSTRACT

In the developing neuron system, the correct axon guidance is essential for linking the axons to their targets. Many proteins are involved in the signaling pathway of the growth cones. Some signal proteins attract the growth cone to become an axon while others proteins repel it from the wrong direction. The Semaphorins belongs to a large family of secreted and membrane associated proteins, which are involved on axon navigation, fasciculation and synaptic formation, besides the role on tumor progression, angiogenesis and B-lymphocyte differentiation. Class 5 Semaphorin are transmembrane proteins, containing seven thrombospondin repetitions. Two members of this family are found on invertebrates, Sema5A and Sema5B. There are few studies on the literature regarding Sema5A and 5B. Questions about modulation, cellular expression and reverse signaling are yet to be answered. This work has the objective of identify putative ligands for the cytoplasmatic domains of Sema5A and Sema5B through employment of Yeast Two-Hybrid System (Y2H). The Yeast Two-hybrid System is a powerful tool for identify proteins from an expression library that interact whit a protein of your interest. Coding DNA for the cytoplasmatic domains of Sema5A and Sema5B (Sema_5A e Sema_5B) where amplified, digested, and cloned on pGILDA plasmids. Mini and maxi preps of these plasmids (baits) where made on DH5 α and sequenced to verify the correct assembly. The bait plasmids were transformed on RFY 206 yeasts. The Sema5B construction on pGILDA, transformed on RFY 206 did not induce autoactivation, while the Sema5A did, as of these result, the constructed Sema5A expression vector are not able to be used on the Y2H system. Sema5B bait was used to screen an expression library from olfactory epithelium. 11 interaction positive clones were identified. Tree proteins, with the correct ORF (open reading frame), where identified: Cript, Scramblase 2 e Trappc6a. Some publication indicated a viable biological interaction between these proteins and Sema5B.

Key-words: Semaphorin, Neurogenesis, Yeast two hybrid, Y2H, Molecular biology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 A Família das Semaforinas e seu Envolvimento na Navegação Axonal.....	9
1.2 Semaforinas de Classe 5	11
1.3 Sistema Duplo - híbrido em Levedura.....	17
1.4 Resultados Anteriores.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Desenho de Iniciadores.....	25
3.2 Reação de Transcriptase Reversa	26
3.3 Obtenção dos Insertos por PCR.....	26
3.3.1 Inseto Sema5A Domínio Citoplasmático	27
3.3.2 Inseto Sema5B Domínio Citoplasmático	27
3.4 Replicação do pGILDA	28
3.5 Digestões	28
3.5.1 Digestão dos Insertos.....	28
3.5.2 Digestão dos Plasmídeos	29
3.6 Ligação	29
3.7 Replicação dos Vetores em Bactérias.....	31
3.8 PCR de Colônia	31
3.9 Transformação em Leveduras	32
3.9.1 Acetato de Lítio/PEG <i>Clontech</i>	32
3.9.2 Eletroporação.....	33
3.9.3 Transformação Rápida.....	34
3.9.4 Adaptado de Woods e Gietz (2005)	34
3.10 Ensaios para verificação das iscas	35
3.10.1 Ensaio de auto-ativação	35
3.10.2 Ensaio de expressão.....	35
3.11 Biblioteca de Epitélio Olfatório.....	36
3.12 Varredura da biblioteca através de “mating”	37
3.13 Potencial de Transativação	39
3.14 Seleção de Colônias Candidatas	39
3.15 PCR de Colônia – Leveduras (Piloto)	40
3.16 Lise de Leveduras e Extração de DNA Plasmidial.....	41
3.16.1 <i>Beads</i> de vidro – Lavagem Ácida.....	41
3.16.2 Lise	42
3.16.3 Precipitação de DNA Plasmidial	42
3.17 Eletroporação e PCR de Colônia – DH5α	42
3.18 Sequenciamento de Nucleotídios.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Desenho de Iniciadores.....	45
4.2 Obtenção de Insertos	46
4.3 Digestões	48
4.4 Quantificação, Ligação e Transformação	50
4.5 PCR de Colônia.	50
4.6 Preparação de Plasmídeo em Pequena Escala e Sequenciamento.	51
4.7 Transformação em Leveduras	52

4.8 Auto-ativação.....	54
4.9 Expressão.....	55
4.10 Viabilidade da Biblioteca para Mating.....	56
4.11 Potencial de Transativação	56
4.12 Seleção de Colônias.....	59
4.13 PCR de Levedura.....	60
4.14 Lise de Leveduras e Purificação de Plasmídeos.....	61
4.15 Eletroporação e PCR de Colônia em Bactérias	63
4.16 Sequenciamento de Nucleotídeos	65
5. DISCUSSÃO	67
5.1 Quanto à Padronização do Sistema de Duplo-híbrido em Leveduras	67
5.2 Quanto à Caracterização das Iscas para Sema 5A e Sema5B.....	67
5.3 Quanto aos Ligantes Obtidos na Varredura com a Isca de Sema5B	68
6. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, o neurônio necessita navegar por um terreno constituído por diversos tipos celulares, processos neuronais e moléculas da matriz extracelular. Tal navegação é observada não só durante o desenvolvimento, mas também em processos regenerativos e patológicos do sistema nervoso, e é mediada por uma infinidade de interações protéicas. A informação que direciona o crescimento do axônio é captada e interpretada por uma estrutura sensorial altamente móvel localizada na extremidade mais distal do axônio, nomeada de cone de crescimento. Moléculas específicas que direcionam o crescimento axonal ligam-se a receptores na superfície do cone de crescimento e ativam vias de sinalização intracelular (WIT, DE; VERHAAGEN, 2003). Um grande número de moléculas sinalizadoras e de seus respectivos receptores, que guiam os axônios para alvos apropriados, tem sido identificado por diferentes sistemas e em vários tipos de organismos (MUELLER, 1999). Estas moléculas, tanto atraentes como repelentes, incluem moléculas mediadoras através de contato, normalmente envolvidas no contato célula-célula, e moléculas secretadas. Muitas delas apresentam bifuncionalidade, ou seja, atuam de forma dual: como quimioatrativas ou quimiorepelentes. Essa diferença de função é dependente de uma variedade de fatores que incluem: o estado intracelular do cone de crescimento, expressão diferencial de complexos receptores e a relação entre as diferentes cascatas de sinalização intracelulares (HUBER et al., 2003).

Dentre as famílias de moléculas sinalizadoras e receptoras que regulam o direcionamento axonal encontram-se os receptores do tipo tirosino-quinase (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010) e tirosino-fosfatase; as moléculas de adesão celular pertencentes à família das imunoglobulinas (KAMIGUCHI; LEMMON, 2000); as caderinas (RANSCHT, 2000); as plexinas e neuropilinas, consideradas como receptores prototípicos de semaforinas (SEMAs) (TAMAGNONE; COMOGLIO, 2000); as semaforinas (WIT, DE; VERHAAGEN, 2003); as netrinas e os receptores de netrinas (GOODMAN ET AL., 1999; KENNEDY, 2000) e a família Robo e os seus receptores (GIGER; KOLODKIN, 2001).

1.1 A Família das Semaforinas e seu Envolvimento na Navegação Axonal

Existem vários mecanismos e moléculas que guiam os axônios na direção de alvos específicos, tanto no desenvolvimento como no processo de maturação e regeneração do sistema nervoso (TESSIER-LAVIGNE; GOODMAN, 1996; MUELLER, 1999; PATEL; VACTOR, VAN, 2002). Entre os mecanismos existentes, algumas famílias de proteínas atuam como fatores de direcionamento axonal, provendo informações que permitem o encontro correto entre processos neuronais e alvos específicos do sistema nervoso.

Dentre estas moléculas, as semaforinas (SEMA) pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, sendo muitas dessas proteínas envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, atuando como inibidores ou quimiorrepelentes (KOLODKIN et al., 1992; MATTHES et al., 1995; KOLK et al., 2009). Porém estudos recentes indicam que as semaforinas também podem influenciar a navegação axonal realizando quimioatração (PASTERKAMP et al., 2003).

A família SEMA inclui pelo menos vinte membros diferentes em vertebrados e três em invertebrados, como insetos e nematódeos. Até o presente momento, as semaforinas foram descritas como moléculas ligantes que atuam sobre determinados receptores como as plexinas, neuropilinas, Off-track, receptor tirosino-quinase Met, CD-72, Tim-2 e integrina. (WIT, DE; VERHAAGEN, 2003). Todas as semaforinas contêm um domínio amino-terminal extracelular de cerca de 500 aminoácidos nomeado domínio semaforina (SEMA) contendo 17 cisteínas altamente conservadas e uma região carboxi-terminal classe-específica que pode conter motivos adicionais.

As semaforinas também diferem com respeito à sua topologia, podendo ser secretadas, transmembrânicas ou ancoradas à superfície celular por glicosilfosfolinositol (GPI) (GOODMAN et al., 1999).

Estas características estruturais juntamente com a análise filogenética permitiram a designação de 8 classes, onde todas as semaforinas conhecidas até o momento podem ser agrupadas (GOODMAN et al., 1999). Semaforinas classe 1 e classe 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 estão presentes predominantemente em vertebrados, e uma classe final (classe V) são proteínas codificadas por vírus. (**Fig. 1**)

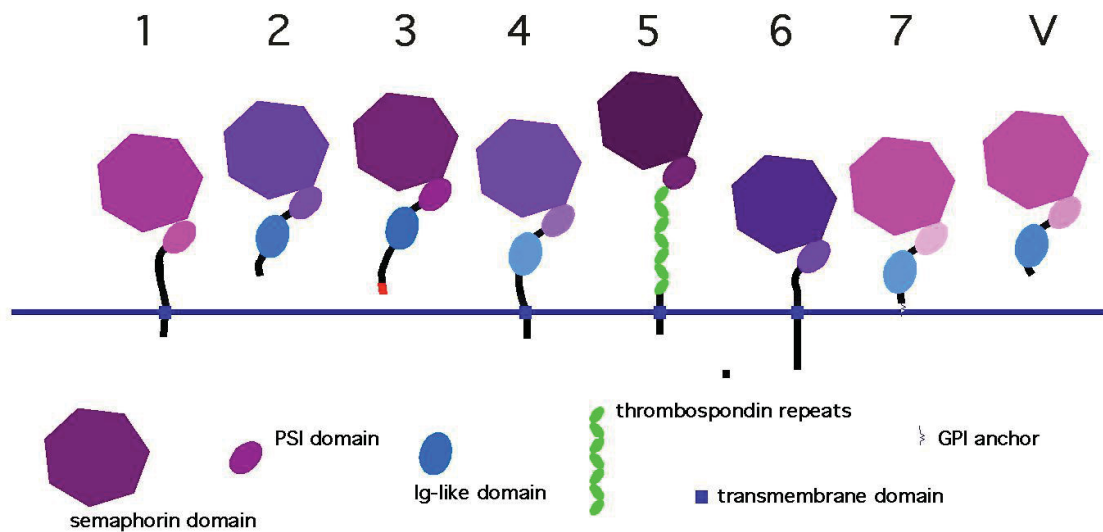


Figura 1: Representação esquemática da família de proteínas Semaforina. As 8 classes estão representadas conforme a topologia e domínios conservados na sequência protéica. As classes 1 e 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 em vertebrados e classe V engloba semaforinas virais. As semaforinas 1, 4, 5 e 6 são proteínas transmembrânicas, as semas 2, 3 e V são secretadas e a Sema classe 7 pode ser encontrada GPI ancorada ou na forma secretada (FONTE: adaptado de Semaphorin nomenclature committee, 1999).

Os receptores característicos das semaforinas são as plexinas. Nove tipos de plexinas já foram identificados em mamíferos e classificados em quatro classes distintas (classes A-D), sendo que seqüências relacionadas também foram encontradas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (WINBERG et al., 1998). Plexinas são proteínas transmembrânicas cujo domínio extracelular rico em cisteína compartilha regiões de homologia com receptores para fator de cicatrização. O domínio extracelular das plexinas contém cerca de 500 aminoácidos correspondentes ao domínio semaforina. Deve-se ressaltar que este último apresenta-se relacionado de forma distante ao domínio Sema das Semaforinas. A região citoplasmática contém uma seqüência de aproximadamente 600 aminoácidos, altamente conservada entre as diferentes plexinas, apresentando similaridade de seqüência a proteínas ativadoras de Ras GTPase (GAPs); (GOODMAN ET AL., 1999; ROHM; RAHIM; ET AL., 2000; OSTER ET AL., 2003). Evidências na literatura (ROHM; OTTEMEYER; et al., 2000; ZANATA et al., 2002), apontam que as plexinas podem possuir atividade GAP intrínseca que é essencial para sua habilidade de induzir colapso do cone de crescimento e regular diretamente a atividade de pequenas GTPases, como Rnd1 e RhoD. Semaforinas secretadas (classe 3) não se ligam diretamente a plexinas; estas últimas se associam com neuropilinas, formando um receptor heterodimérico para estas semaforinas. Contudo, as plexinas provavelmente são os receptores comuns protótipos das

semaforinas, enquanto que o requerimento de proteínas auxiliares como as neuropilinas podem representar um caso especial para semaforinas classe 3 (RAPER, 2000).

Muitos estudos sobre a sinalização mediada por semaforinas focaram-se em como a ativação de plexinas regulam as mudanças que ocorrem no citoesqueleto e provocam um sinal repulsivo (HALLORAN; WOLMAN, 2006). Uma forma secretada de semaforina, Semaforina 3A (Sema3A), é sintetizada como um precursor inativo, tornando-se repulsiva para neuritos sensoriais e simpáticos após processamento proteolítico (ADAMS et al., 1997). A exposição de Sema3A aos cones de crescimento de axônios induz a uma dramática redistribuição dos filamentos de F-actina resultando no seu colapso. Contudo os eventos posteriores na cascata de transdução de sinal que traduz os sinais desencadeados a partir da interação dos fatores quimiossolúveis com seus receptores e que leva às modificações do citoesqueleto, não são completamente conhecidos (CASTELLANI; ROUGON, 2002).

Os mecanismos de sinalização mediados por alguns membros das Semaforinas, principalmente pela Sema3A, já estão bem compreendidos. Contudo, como será visto a seguir, muito pouco se sabe sobre as funções fisiológicas e sinalizações envolvidas realizadas pelas semaforinas de classe 5, que são proteínas integrais de membrana. Destas últimas, a Sema 5B é a menos conhecida. Nesse sentido, o presente trabalho pretende contribuir para o entendimento da Sema 5B através da capacitação de ferramentas de estudo para a identificação e caracterização de interações realizadas pela porção citoplasmática dessa proteína.

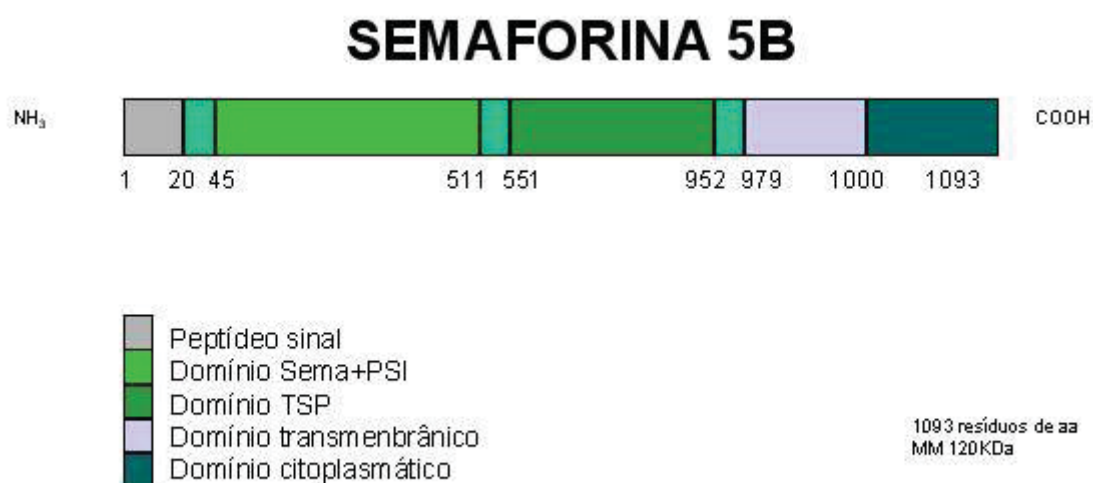
1.2 Semaforinas de Classe 5

A nomenclatura para semaforinas foi revisada em 1999 a fim de se padronizar as diferentes denominações para as proteínas desta família. As semaforinas F e G foram renomeadas para semaforinas 5A e 5B, respectivamente (GOODMAN et al., 1999).

As semaforinas 5A e 5B pertencem à classe 5 e foram identificadas em 1996, por ADAMS e colaboradores. Ambas são constituídas de uma região N-terminal extracelular contendo 485 aminoácidos, correspondente ao domínio Sema (esse também é conhecido como domínio Sema+PSI; PSI é um peptídeo que possui

seqüência conservada em plexina, semaforinas e integrinas), uma região modular com 408 resíduos compondo sete repetições de uma seqüência com alto grau de homologia às repetições encontradas em tromboespondinas 1 e 2 (TSP – type 1 repeat) (ADAMS; TUCKER, 2000), um único domínio hidrofóbico transmembrânico e uma região citoplasmática C-terminal de 80 (Sema 5A) ou 93 aminoácidos (Sema 5B). Esta última é o domínio que apresenta o menor grau de similaridade entre Sema 5A e 5B em comparação a outras regiões destas proteínas (ADAMS et al., 1996). A identidade das seqüências de aminoácidos de Sema 5A e 5B é de 58%, enquanto que a similaridade entre elas é de 72% (ADAMS et al., 1996). O domínio TSP é encontrado somente nas semaforinas de classe 5 (**Fig. 2**).

A



B

Sequência de aminoácidos dos dominós citoplasmáticos:

Sema 5A: 993-1077

YTYCQRYQQSHDATVIHPVSPAALNSSITNHINKLDKYDSVEAIKAFNKNLILEERNKY
FNPHLTGKTYSNAYFTDLNNYDEY

Sema 5B: 1000-1093

SCQHCQRQSQUESTLVHPATPNHLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNLIPDDRANFY
PLQQTNVYTTTTYYPSPLNKPSERPEASPGQRCEPNS

Figura 2: A) Representação esquemática da proteína Semaforina 5B. Esta proteína possui 1093 aminoácidos e massa molecular predita de 120 kDa. Sema5B é composta de um peptídeo sinal (1-20 aa), um domínio sema + PSI (45-544 aa), 7 repetições do tipo tromboespondina 1 (TSP-1; 551-952 aa); um domínio transmembrânico composto de 20 resíduos de aminoácidos (979-999 aa) e uma região citoplasmática (1000-1093 aa). **B)** Sequências de aminoácidos da região citoplasmática das Semaforinas 5A e 5B (Sema 5A e Sema 5B).

Sema5A e 5B são diferencialmente expressas nos tecidos embrionários e adultos. Análise de “Northern blot” de mRNAs isolados de embriões de camundongos revelou a presença de dois transcritos para Sema5A com 5.5 e 9.4 kb e um único mRNA para Sema5B com 5.9 kb, cuja abundância diminui do dia embrionário 10 (E10) ao nascimento (ADAMS et al., 1996). Nos tecidos adultos, além do cérebro, são encontrados três transcritos de Sema5A. Já para Sema5B verificou-se a presença de um único transcrito de 5.9 kb, o qual é expresso exclusivamente no cérebro (ADAMS et al., 1996). Ensaios de hibridização *in situ* em tecidos de camundongos (E9,5) detectaram transcritos de Sema5A em células mesodérmicas, esclerótomos, placa lateral mesodérmica, arcos branquiais, membros em desenvolvimento e na notocorda. Enquanto Sema5B é expressa exclusivamente no neuroepitélio ao longo do eixo antero-posterior, e apresenta uma fraca expressão na região mais caudal do tubo neural (ADAMS et al., 1996).

As semaforinas de classe 5 são caracterizadas pela presença de repetições tipo tromboespondina (TSP), sugerindo a participação dos membros desta classe nos fenômenos de neuritogênese e quimioatração neuronal (ADAMS ET AL., 1996; ADAMS; TUCKER, 2000). Tromboespondinas constituem uma família de glicoproteínas extracelulares ligantes de cálcio. São abundantemente expressas na matriz extracelular embrionária. Várias proteínas compartilham as repetições do tipo tromboespondina -1 (TSP-1), sendo muitas destas expressas no sistema nervoso em desenvolvimento. O padrão de expressão e propriedades *in vitro* sugere funções potenciais para TSP-1 na navegação axonal e migração do cone de crescimento. As repetições de TSP-1 têm sido implicadas na diferenciação, no crescimento de neuritos, no desenvolvimento do sistema nervoso e em processos de regeneração e adesão neuronal (ADAMS; TUCKER, 2000).

É possível que as repetições TSP estejam implicadas na associação de Sema5A com outras proteínas. Foi visto que Sema5A liga-se a plexina 3B e que o domínio TSP é importante para essa interação (ARTIGIANI et al., 2004). Nesse mesmo trabalho, os autores usaram Sema5B como controle e não identificaram ligação desta com as plexinas 3A, 3B ou 3C. A proteína Sema5B também possui o domínio TSP (ADAMS et al., 1996; ADAMS; TUCKER, 2000), porém não está claro se esta molécula está envolvida com neuritogênese, desde que resultados preliminares utilizando Sema5B recombinante mostraram uma ausência de modulação positiva ou negativa da neuritogênese (PÜSCHEL, 1999).

Kantor *et al* (2004) foram capazes de mostrar que Sema5A pode desencadear respostas tanto atrativas quanto repulsivas no direcionamento de axônios do fasciculus retroflexus (FR), um feixe de nervos do diencéfalo associado a funções do sistema límbico. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram que domínio de repetições TSP da Sema5A interage fisicamente com a porção glicosaminoglicana de dois tipos de proteoglicanos: os condroitin sulfato (CSPGs) e os heparan sulfato (HSPGs). A ligação da Sema5A com CSPG inibe a extensão de axônios FR, enquanto que a interação dessa semaforina com HSPG é necessária para atração axonal (KANTOR *et al.*, 2004). Portanto, a natureza da resposta do cone de crescimento à Sema5A é dependente do domínio TSP e modulado de acordo com o tipo de proteoglicano presente no ambiente, durante o desenvolvimento (HILARIO *et al.*, 2009). Shipp e Hsieh-Wilson (2007), demonstraram que a Sema5B também tem a capacidade de se ligar a CSPG e HSPG, identificando os tipos de glicosilação mais relevantes, porém sem realizar nenhum teste de função (SHIPP; HSIEH-WILSON, 2007).

Ainda quanto à Sema5A, resultados evidenciaram que essa proteína age de forma inibitória nos axônios do disco óptico e do nervo óptico, mesmo na presença de moléculas atrativas e neuritogênicas, como laminina, L1 e netrina (OSTER *et al.*, 2003). Nesse mesmo trabalho, os autores não foram capazes de identificar Sema 5B nesses locais do sistema visual.

No trabalho de Fiore *et al.*, (2005) foi desenvolvida uma linhagem de animais nocautes para semaforina 5A. Os resultados desse artigo mostraram que esses camundongos são inviáveis, já que os embriões que não possuem o gene para Sema5A não sobrevivem após o dia do desenvolvimento embrionário 12.5 (E12.5). A análise dos embriões nocautes revelou que a estrutura geral do sistema vascular, o desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários, e o sistema nervoso apresentam-se normais. Contudo observou-se a diminuição no número de vasos de grande diâmetro na região cranial de embriões E10.5. Esses vasos não formam as ramificações adicionais e não estabelecem a sua organização e estruturação normal (FIORE *et al.*, 2005). Este fenótipo implica que Sema5A não está envolvida na diferenciação de vasos sanguíneos em geral, mas atua na padronização regional da vasculatura. Especificamente as ramificações dos vasos cardinais craniais possuem anormalidades e provavelmente Sema5A está envolvida na estabilização destes vasos sanguíneos.

É importante destacar que a classe 5 das semaforinas é a única que possuem representantes tanto em vertebrados (Sema5A e Sema5B), como em invertebrados. Nesses últimos, Sema-5c, foi identificada em *Drosophila m.* e parece estar envolvida no comportamento olfativo desses insetos (ROLLMANN et al., 2007). Woodhouse et al. (2003) demonstraram, usando drosófilas como modelo, que Sema5C está envolvida no processo de tumorigênese e metástase. Resultados deste mesmo trabalho detectaram a expressão de semaforinas humanas, Sema5A e Sema5D, homólogas à Sema5C, na membrana de células A2058, uma linhagem de melanoma humano (WOODHOUSE et al., 2003).

Em Lett et al., (2009), fica clara a função da Sema5B durante o desenvolvimento de áreas cerebrais. Eles demonstram que a Sema5B influencia a formação do córtex cerebral, atuando como uma molécula “encapsuladora” de axônios, evitando a formação de sinapses entre regiões distintas do cérebro em formação (LETT et al., 2009).

De fato, as semaforinas transmembrânicas, como as da classe 5, apresentam um aspecto interessante: elas podem funcionar como ligantes e deflagrar um sinal através da ligação de seu domínio extracelular a um receptor de superfície e, ao mesmo tempo, podem agir como receptores e passar um sinal para o interior da célula através de sua cauda citoplasmática, após interação com ligantes específicos (TAMAGNONE; COMOGLIO, 2004). To et al. 2007, demonstrou o papel da Sema5B como ligante inibitório, induzindo o colapso de cones de crescimento em gânglios da raiz dorsal de galinha (DRG) através do influxo de Ca^{+2} extracelular. Os resultados indicam que essa resposta é dependente das cascatas de sinalização da fosfatase calcineurina e da protease capaína (TO et al., 2007). Em outro trabalho recente, foi mostrado que a Sema5B pode sofrer um processamento proteolítico, fazendo com que a sua porção Sema passe a se comportar como uma molécula secretada dentro do hipocampo de neonatos. Esta porção mantém sua função biológica atuando na inibição de formação de sinapses (O’CONNOR et al., 2009).

De acordo com o que foi mencionado acima, fica claro que há ainda pouco conhecimento a respeito das semaforinas de classe 5, sobretudo quanto à Sema5B. Como foi visto, os artigos que foram publicados sobre as semaforinas de classe 5 elucidaram alguns aspectos importantes de Sema5A, mas com relação a Sema5B poucos resultados foram obtidos. Bem como o estudo das Semas5A e 5B como receptor é pouco estudado.

Atualmente, com os genomas de vários organismos já decifrados e disponíveis em bancos de dados públicos, o estudo de proteoma foi facilitado e ganhou destaque. Dentro deste cenário, a elucidação de redes de interações entre proteínas (Interactomas) vem sendo empregada para a obtenção de pistas valiosas sobre os papéis funcionais das moléculas em diferentes contextos biológicos.

Nesse sentido, o projeto em questão pretende identificar, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras, os parceiros moleculares das porções citoplasmáticas das Semas5A e 5B (Sema_5A e Sema_5B). A procura por ligantes protéicos destas moléculas poderá levar a um entendimento orquestrado das suas funções em diversos contextos biológicos. Além de poder trazer resultados inéditos e de alto impacto na área de desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso. A implementação do sistema de duplo-híbrido no laboratório em questão, será de extrema importância para não só a identificação e caracterização de ligantes de Sema_5A e _5B como também uma metodologia de vanguarda biotecnológica a ser aplicada por diversos parceiros produzindo conhecimento.

Durante o seu pós-doutorado, a orientadora do presente projeto padronizou e desenvolveu no laboratório da Dra. Bettina Malnic (Depto. Bioquímica-IQ, USP) um sistema de duplo-híbrido em leveduras para identificar proteínas ligantes de receptores olfatórios. Algumas iscas, correspondentes a domínios específicos do ORM93 (receptor olfatório) de camundongo, foram construídas. Outra ferramenta importante produzida foi uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório. Varreduras dessa biblioteca com diferentes iscas foram realizadas e atestaram que a representatividade das mensagens do epitélio olfatório foi mantida na biblioteca em questão (DANNECKER, VON et al., 2005). Lett *et al.* (2009) evidenciaram a presença de Sema5B no bulbo olfatório e um pequeno nível de expressão no epitélio olfatório (LETT et al., 2009). Assim, dispondo da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório e levando-se em consideração a presença de Sema5B nesse tecido, decidiu-se investigar os ligantes das semaforinas de classe 5 através de varreduras dessa biblioteca, utilizando-se a metodologia do duplo-híbrido (ver adiante). Deve-se mencionar ainda que grande parte do epitélio olfatório seja composta por tecido nervoso periférico (neurônios olfatórios) (GUYTON; HALL, 2002) e assim as interações identificadas poderão ser extrapoladas para a função das semaforinas de classe 5 no sistema nervoso central. Além disso, essas interações também poderão

contribuir para o entendimento da participação dessas semaforinas no sentido do olfato.

1.3 Sistema Duplo - híbrido em Levedura

O sistema de duplo-híbrido em leveduras é uma ferramenta que foi desenvolvida nas últimas décadas e hoje em dia é uma tecnologia bastante usada para detectar interações protéicas *in vivo*.

A técnica baseia-se na separação artificial de domínios de reguladores de transcrição procariontes, que naturalmente são íntegros. Esses reguladores contêm um domínio de ligação para DNA na região promotora e um domínio de ativação, que direciona o complexo da RNA polimerase II a transcrever o gene em questão. Normalmente, esses dois domínios fazem parte de uma mesma proteína. Através da tecnologia do DNA recombinante é possível separar fisicamente esses dois domínios peptídicos, que, se expressos em uma mesma célula, não poderão ativar a transcrição, a menos que sejam aproximados fisicamente na região do promotor (BRENT; PTASHNE, 1985).

O sistema duplo-híbrido "DupLex-ATM" (OriGene Technologies, Inc.), que foi utilizado nesse trabalho, fornece alguns vetores que permitem a clonagem de genes que codificam para proteínas capazes de interagir entre si e a co-expressão destas nas células de levedura em fusão com os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) separadamente. Nesse sistema, o DNA-BD vem como parte da proteína LexA de procariontes e o AD é o peptídeo de 88 resíduos (B42) que ativa a transcrição em levedura. A interação entre uma proteína isca (que é expressa em fusão com o DNA-BD) e uma outra proteína codificada por um gene presente em uma biblioteca de cDNA (expressa em fusão com o AD) cria um novo ativador transcricional capaz de ativar genes-repórteres regulados por operadores LexA (**Fig. 6**). O produto gerado pela expressão destes genes-repórteres torna possível que a interação entre duas proteínas seja detectada fenotipicamente (AUSUBEL *et al.*, 1999).

O “kit” “DupLex-ATM” disponibiliza os seguintes vetores e cepas:

Vetores:

- **pGilda (OriGene) (Fig. 3):** Vetor onde foram inseridos os fragmentos de DNA que codificam para domínios específicos de Sema_5B e Sema_5A fusionados com o domínio DNA-BD (proteína LexA). Essas construções são usadas como “iscas”. A grande vantagem desse plasmídeo é que ele possui o promotor GAL1 induzível por galactose, o que permite a expressão da isca por tempos limitados durante a varredura da biblioteca, reduzindo a exposição das leveduras às iscas tóxicas;

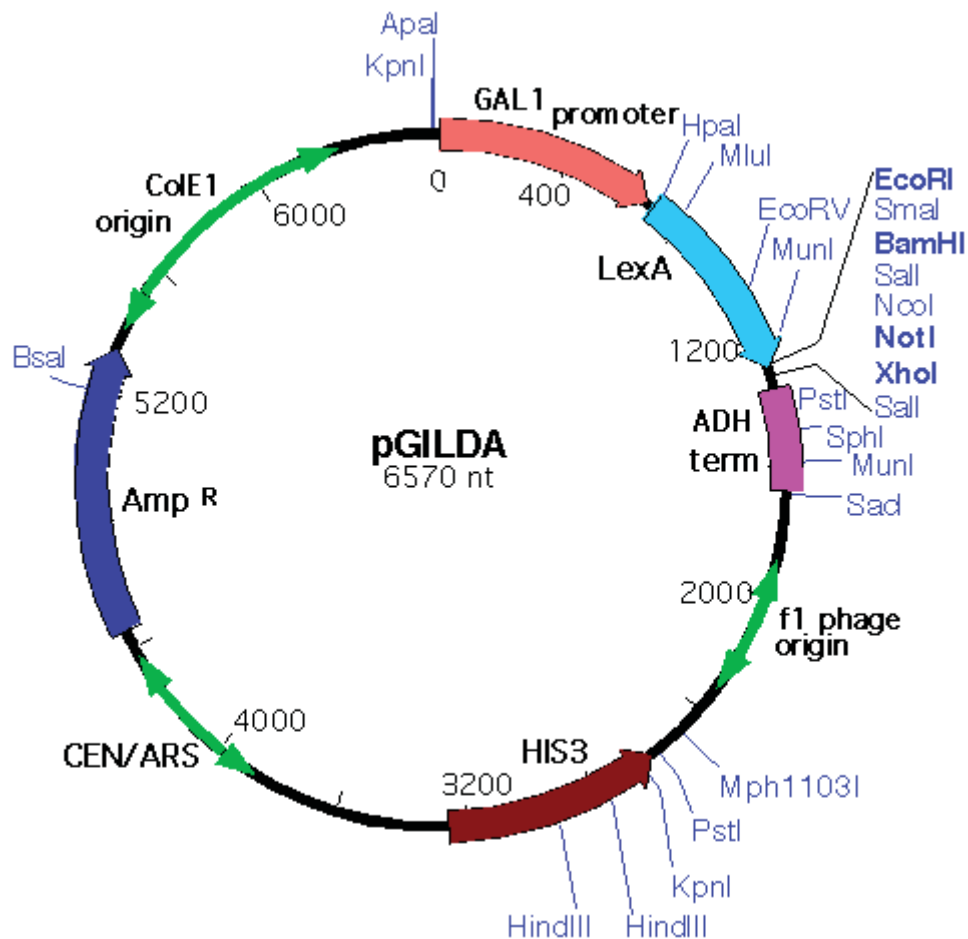


Figura 3: ESQUEMA DO PLASMÍDEO pGILDA mostrando a região promotora **GAL1** para expressão regulada por galactose; **Região CEN/ARS** para replicação em leveduras com manutenção de uma cópia por célula; **Região LexA-MCS** com múltiplos sítios de restrição para inserção de fragmentos da proteína de interesse a serem transcritas em fusão com a proteína LexA; Marcador **HIS3** para seleção em leveduras; **Gene Amp^r**: Confere resistência ao antibiótico Ampicilina; **ori E1** para replicação em *E. coli*.

- **pJG4-5** (OriGene) (**Fig. 4**): esse vetor é usado para a construção da biblioteca de cDNA. Esse plasmídeo possui, logo após a sequência codificadora do domínio de ativação (o peptídeo B42), o sítio múltiplo de clonagem, onde é inserido a biblioteca de cDNA do tecido pretendido. Esse vetor também possui o promotor GAL1, induzível por galactose.

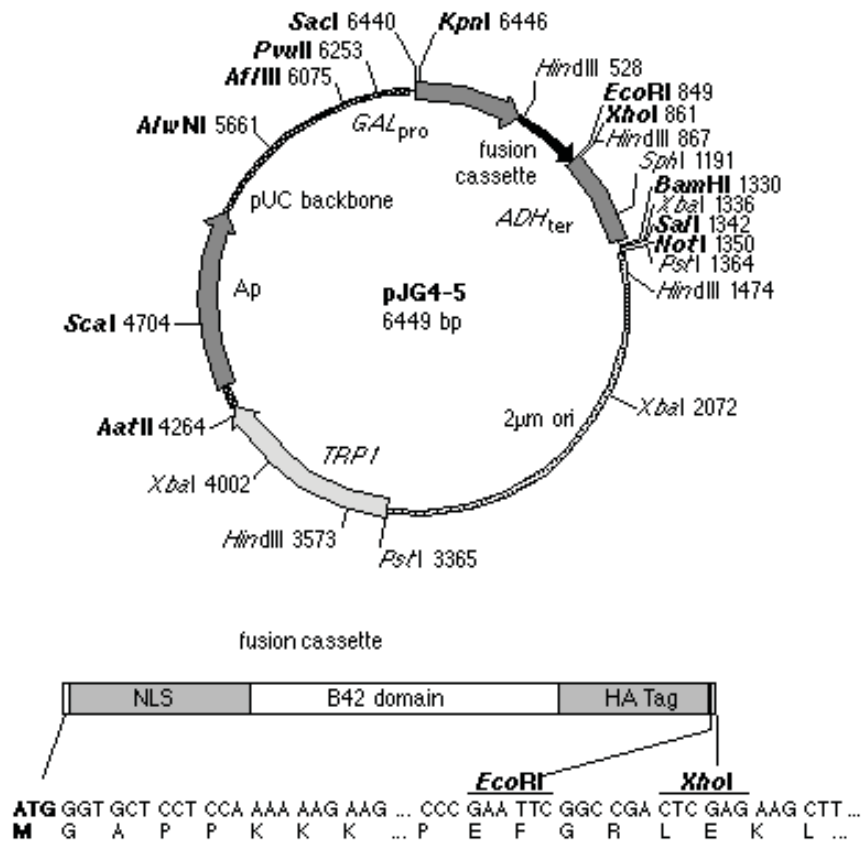


Figura 4: ESQUEMA DO PLASMÍDEO pJG4-5: Mostra a região promotora **GAL1** para expressão regulada por Galactose de: **NLS**: Sinal de localização nuclear; **Domínio B42**: Domínio de ativação do sistema D-H; **HA tag**: Tag de hemaglutinina para ensaios de precipitação e **Cassete de fusão**: Região onde as Sequência da biblioteca são fusionadas. **Região TRP1**: para seleção em leveduras. Outras regiões existem, mas não estão indicadas.

- **pSH18-34** (OriGene) (**Fig. 5**): Este vetor possui regiões de ligação para DNA-BD (Lex-A) e induzido pelo AD (B42). Quando ambos as porções se encontrarem próximos, a enzima β -galactosidase é expressa (neste sistema, a proximidade necessária destes domínios só é obtida quando a isca produzida pelo pGilda interage com a proteína expressa pelo pJG4-5) modificando a cor da colônia de levedura cultivada com x-gal reportando uma interação.

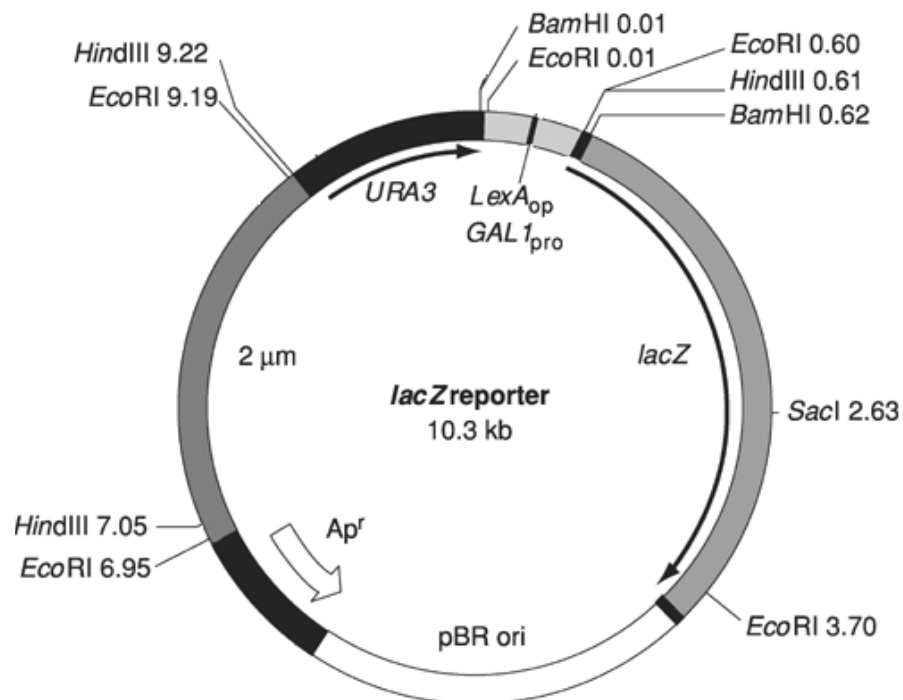


Figura 5: Esquema do plasmídeo pSH18-34: Mostra a Região promotora **GAL1** e o **operon LexA** para expressão regulada por galactose e pela ocorrência do BD Lex-A; O **gene LacZ** que sintetiza a β -Galactosidade que degrada X-Gal; Gene **URA3** para seleção em leveduras; Gene **Apr** que confere resistência para ampicilina

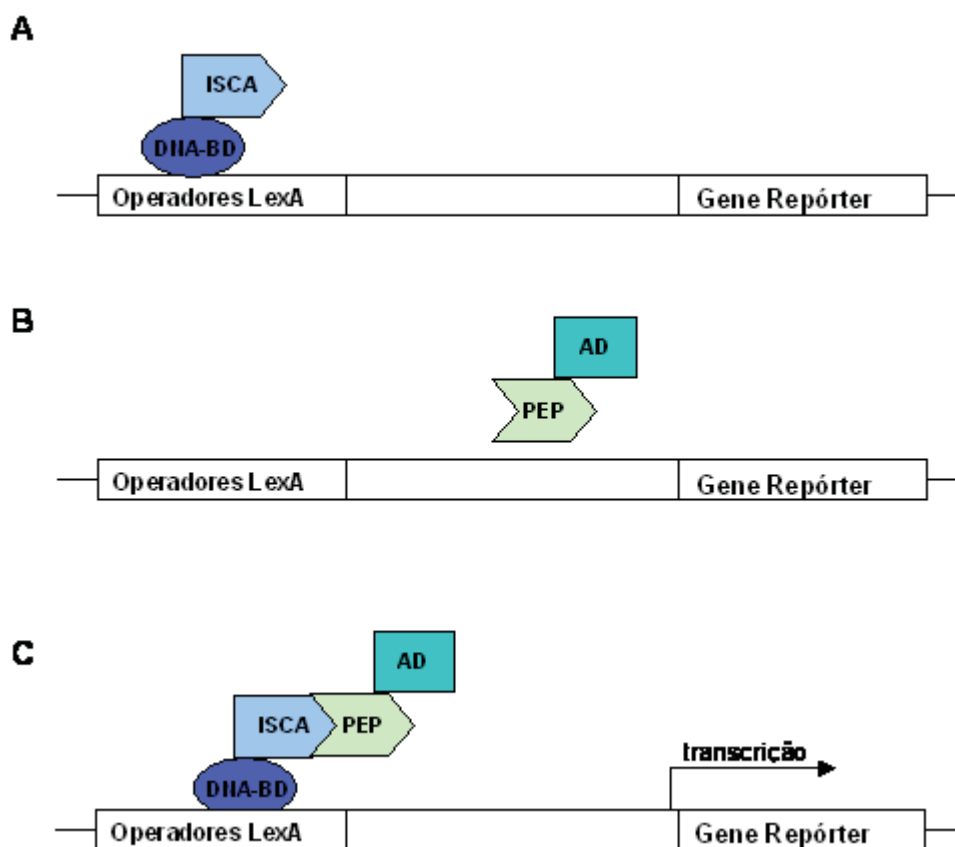


Figura 6: Diagrama esquemático do sistema de duplo-híbrido em leveduras.

- A)** A proteína usada como isca em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-BD), liga-se aos operadores LexA, mas não é capaz de ativar a transcrição sem o domínio de ativação (AD).
B) Na ausência da proteína, o peptídeo (PEP) proveniente de uma biblioteca, em fusão com AD não se liga aos operadores e, portanto, não ativa a transcrição.
C) A transcrição dos genes repórteres é ativada somente se houver interação entre isca e o peptídeo da biblioteca, pois assim os domínios DNA-BD e AD serão aproximados.

Cepas de levedura:

- **EGY48** - MAT α *trp1 his3 ura3 leu2*: 6 LexAop-LEU2

Essa cepa possui o gene repórter LEU2 integrado ao cromossomo, controlado por 6 operadores LexA. Quando esse gene é expresso, essa levedura é capaz de crescer em meio sem leucina. A biblioteca de cDNA é transformada nessa cepa;

- **RFY206** - MAT α *trp1 Δ :hisG his3 Δ 200 ura3-52 lys2 Δ 201 leu2-3*

Nessa cepa são inseridos os vetores das iscas e o vetor contendo o gene repórter lacZ.

A RFY206 e a EGY48 são capazes de se juntar (*mating*) e formar células diplóides.

1.4 Resultados Anteriores

Durante seu mestrado, a aluna Jaqueline A. M. Trentin, sob a orientação da Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante, iniciou no laboratório a produção de ferramentas para o estudo da Semaforina 5B. Assim, o domínio citoplasmático desta proteína (₆His-CITO) foi clonado e expresso de forma heteróloga em bactérias e purificado. Este domínio recombinante ligado à Ni-NTA-Agarose foi então usado em ensaios de “pull-down” (ensaios de ligação *in vitro*) e ligantes provenientes de extratos de cérebros de camundongos puderam ser identificados, após separação em eletroforese bidimensional e análise em espectrometria de massa por PMF (“Peptide Mass Fingerprint”). Os ligantes obtidos mais interessantes e que apresentaram um significado biológico foram tubulina e a actina. Especula-se que Sema5B se ligue a essas proteínas através do seu domínio citoplasmático e altere o citoesqueleto da célula onde ela se encontra. Como já mencionado, o fato de Sema5B ser uma proteína integral de membrana sugere que ela pode funcionar tanto como um ligante (através de ligação de seu domínio extracelular com um receptor), como um receptor (através da sinalização intracelular mediada por seu domínio citoplasmático). Nesse sentido, os resultados obtidos indicam um possível papel para Sema5B como receptor, o qual poderá ser mais bem investigado. Recentemente, o sinal de Sema5B como ligante foi abordado. Kenneth *et al.* (2007) mostraram que o domínio Sema de Sema5B (região extracelular) induz o colapso do cone de crescimento através da indução de um influxo de Ca^{+2} , causando um aumento deste cátion no interior da célula. Os sinais posteriores que são deflagrados envolvem a atividade de calpaína e calcineurina, que em conjunto modulam o citoesqueleto promovendo o colapso do cone de crescimento.

Dessa forma, através de ensaios de “pull-down” e identificação dos ligantes por espectrometria de massa, alguns parceiros moleculares de Sema5B, que se ligam ao seu domínio citoplasmático (intracelular), puderam ser encontrados. Para complementar esses resultados, o presente projeto pretendeu iniciar a montagem do sistema de duplo-híbrido em leveduras para identificar e/ou confirmar interações com o domínio citoplasmático de Sema5B. Além disso, o domínio citoplasmático de Sema5A também será usado nesse mesmo sistema para comparar as interações obtidas entre essas duas semaforinas. Deve-se lembrar que a identidade das seqüências de aminoácidos de Sema 5A e 5B é de 58%, enquanto que a

similaridade entre elas é de 72%. E o domínio citoplasmático é o que apresenta o menor grau de similaridade entre Sema5A e 5B em comparação a outras regiões destas proteínas (ADAMS et al., 1996).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar e caracterizar interações protéicas dos domínios citoplasmáticos da Sema5A e Sema5B (Sema_5A e Sema_5B) através do método de duplo-híbrido em leveduras. Deve-se ressaltar que o presente trabalho também teve como objetivo contribuir na implementação deste sistema na UFPR.

Objetivos específicos

- a) Construção das iscas referentes aos domínios citoplasmáticos de Sema5A e Sema5B no pGilda (Iscas);
- b) Transformação das iscas em levedura;
- c) Verificação do potencial de auto-ativação das iscas;
- d) Verificação da expressão correta das iscas;
- e) Varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório com as iscas de interesse através de “mating”;
- f) Sequenciamento e identificação dos ligantes obtidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho de Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados a partir do reconhecimento das sequências utilizando-se a base de dados *on-line* do NCBI (National Center for Biothechnologies Information), onde as sequências nucleotídicas complementares (cDNA) das proteínas Sema5A e Sema5B foram obtidas.

Sema5A: ACCESSION NM_009154 REGION: 659..3883
VERSION NM_009154.2 GI:119226252 (*Mus musculus*)

Sema 5B: ACCESSION NM_013661 REGION: 292..3573
VERSION NM_013661.2 GI:164698461 (*Mus musculus*)

Ambas foram submetidas ao aplicativo *on-line* ORF Finder no mesmo sitio da NCBI, paralelamente, as sequências protéicas foram obtidas a partir da base de dados Swiss-Prot no sitio eletrônico ExPASy (Expert Protein Analysis System).

Enquanto a informação fornecida pelo ORF Finder relaciona a sequência de nucleotídeos com a de aminoácidos, a informação fornecida pela base de dados Swiss-Prot apresenta separadamente cada região funcional da proteína pesquisada, fornecendo a identificação de cada domínio e suas sequências de aminoácidos separadamente. A partir da combinação das informações, é possível delimitar a região codificante de cada domínio da proteína no seu respectivo cDNA (DNA complementar).

Cada iniciador foi desenhado manualmente, flanqueando as regiões codificantes das porções citoplasmáticas de Sema5A e Sema5B, incluindo uma região complementar ao cDNA de alguns pares de base e uma região não complementar com sítios de restrição para as enzimas.

Para averiguar quais enzimas poderiam ser utilizadas, foi levado em consideração o mapa da região de clonagem do plasmídeo (**Fig. 3**) e a análise da sequencia codificante através da ferramenta eletrônica NebCutter, onde a sequencia é avaliada quanto a ocorrência de sítios de restrição. Os sítios de restrição são usados para a digestão dos insertos para a sua futura inserção em sítio dirigido nos plasmídeos.

A ferramenta Oligo Analyzer no sitio eletrônico da IDT (Integrated DNA Technologies) foi utilizada para determinar características dos iniciadores quanto ao

T_m , ΔT_m (diferença entre as T_m 's dos iniciadores *F* e *R*), *hairpins*, hetero e homodímeros entre outras.

3.2 Reação de Transcriptase Reversa

Em um tubo para PCR foi adicionado 1µl do iniciador Oligo dT (0,5 µg/µl) e RNA total de cérebro de camundongo (1 µg/µl), proveniente do estoque do laboratório armazenado à -80°C e água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) para um volume final de 5µl; a mistura foi incubada a 70°C por 5 min. para desnaturação do RNA, em seguida foi colocada no gelo por 5 min. Paralelamente, uma segunda mistura foi preparada, composta por tampão ótimo para a enzima, 2,4µl de MgCl₂ (3 mM), 1µl dNTPs (0,5 mM: Promega®) e inibidor de RNase (2U/µl - *RNaseOUT*: Invitrogen®) e água tratada com DEPC para um volume final de. 15 µl. À primeira mistura foram incorporadas a segunda mistura e a enzima transcriptase reversa *Improm II Reverse transcriptase*. A solução final foi incubada em um termociclador por: 25°C/ 5min., 42°C/ 60min., 70°C/ 5min. O cDNA resultante foi acondicionado em um freezer a -20°C até seu uso futuro para obtenção de insertos.

3.3 Obtenção dos Insertos por PCR

Foi realizada primeiramente uma reação piloto para testar as condições da PCR e dos iniciadores encomendados. Posteriormente foram realizadas PCRs em larga escala para ambos os insertos.

O produto da reação piloto foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% e persulfato de amônio 0,1%). A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio a 100 V por 1 hora. A revelação foi feita pela impregnação por nitrato de prata de acordo com (SAMBROOK et al., 2001).

As reações foram realizadas com: Enzima e tampão da Pfu Polimerase da marca Fermentas® (2,5 U/µl), dNTPs (0,5 mM Promega®), iniciadores encomendados da IDT® a partir do desenho desenvolvido (ver a item 3,1), termociclador Mastercycler® Eppendorf® da sala de Multi Usuários financiada pela

FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), tubos de polipropileno de 200 µl. Como molde, foram utilizados o cDNA de cérebro de camundongos e o plasmídeo pET 28a portador da sequência para Sema5B porção citoplasmática já seqüenciado, disponível no laboratório (TRENTIN, 2008). Após a corrida em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (5µg/mL) juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base O'GeneRuller 50bp da Fermentas[®], as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA de interesse foram extraídas e purificadas segundo o kit de gel extração Perfectprep Gel Cleanup da Eppendorf[®].

3.3.1 Inseto Sema5A Domínio Citoplasmático

Foi utilizado para cada reação: 2,5µl de tampão para Pfu -MgSO₄; 3µl de MgSO₄ (1mM); 0,3µl da enzima Pfu Polimerase (2,5 U/µl); 1,5µl de dNTP (0,6 mM); 1,25µl de iniciador F para sema5A (0,3 mM); 1,25µl de iniciador R (0,3 mM); 2 µl de cDNA de cérebro de camundongo (~1 µg DNA); H₂O para um volume final de 25µl. Utilizando-se o termociclador, as reações foram submetidas inicialmente à 95°C por 2 min, então a 35 ciclos a 95°C/40s, 53,2°C/ 45s e 72°C/ 2:30 min, finalmente a reação foi finalizada a 72°C/ 5min. Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. Ao final da corrida, as bandas foram extraídas do gel e purificadas com o kit de gel extração, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram feitas 5 reações de 25µl cada e um tubo de controle negativo (reação na qual foram adicionados todos os reagentes, exceto o DNA molde).

3.3.2 Inseto Sema5B Domínio Citoplasmático

Foi realizada em condições similares às usadas na reação acima. O molde de DNA para a reação foi 1µl do plasmídeo pET 28a (~1µg/ µl) e a temperatura de anelamento usada foi 61,5°C. Da mesma forma, foram realizadas 5 reações de 25µl cada e um controle negativo (reação na qual foram adicionados todos os reagentes, exceto o DNA molde).

3.4 Replicação do pGILDA

Uma alíquota do plasmídeo pGILDA foi gentilmente doada pela Profa. Dra. Bettina Malnic (IQ-USP). Linhagens DH5 α eletrocompetentes de *Escherichia coli* foram utilizadas para replicação em larga escala do plasmídeo para seu uso futuro pelo laboratório. Para isto, 40 μ l da bactéria foram transformados por eletroporação (Eletroporador modelo Gene Pulser X Cell – BioRad[®]) com 10ng do plasmídeo submetendo-se a uma diferença de potencial de 1,40 kV; após a recuperação por 1 hora em 1ml de meio LB (10g/l de triptona; 5g/l de extrato de levedura; 10g/l de NaCl), no agitador orbital (Certomat BS-1 P. Braun[®]) a 37°C foram estricadas em placas de LB + agar com 17g/l de agar adicionado de ampicilina a 100 μ g/ml, a placa foi incubada a 37°C durante a noite. Após esse período, uma colônia foi inoculada em 5ml de meio acrescido do antibiótico durante 8 horas no shaker a 37°C e então foi transferida para um Erlenmeyer de 2l contendo 500ml de LB + Amp e colocada no shaker a 37°C por até 16 horas. Após esse período o plasmídeo foi purificado utilizando-se o kit Qiagen[®] Plasmid Maxi. O plasmídeo purificado foi quantificado por espectrofotometria segundo (SAMBROOK et al., 2001).

3.5 Digestões

3.5.1 Digestão dos Insertos

Os domínios citoplasmáticos purificados dos géis foram então duplamente digeridos. Para o domínio de Sema5A foram utilizadas as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e para o de Sema5B, *Bam*HI e *Xho*I da marca Fermentas[®]. Para cada reação foram usados 50 μ l dos fragmentos amplificados por PCR e purificados por gel-extração; 1,5 μ l de cada enzima (15 unidades); tampão (14 μ l Tango 2x para 5A e 7 μ l Bam 1x para 5B, concentrações ótimas para dupla digestão de acordo com o fabricante Fermentas[®]) e água para um volume final de 70 μ l. A reação foi mantida a 37° durante a noite. Após a digestão as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1% juntamente com 0,5 μ g do marcador de pares de base O'GeneRuller 50bp da Fermentas[®], seguindo para gel extração. O gel foi preparado dissolvendo a agarose em tampão TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM EDTA) ao qual foi adicionado 2,5 μ l brometo de etídio

(10 mg/ml) (Amresco[®]) sob voltagem constante de 70 V por 30 minutos. Após a purificação, as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até o uso.

3.5.2 Digestão dos Plasmídeos

As digestões duplas dos plasmídeos foram feitas em duas etapas devido à proximidade dos sítios de restrição presentes na região de policlonagem do vetor pGilda (**Fig. 3**). Na primeira reação foi usado: 5µl do plasmídeo vazio (~ 8µg); tampão (10µl Tango 2x para 5A e 5µl Bam 1x para 5B); 2µl da enzima *Bam*HI (20 unidades) em ambos e água para volume final de 50µl. Após 16 horas a 37°C, a amostra foi submetida à 80°C por 20 min para desativar a enzima, então foram adicionados 2µl de *Eco*RI (20 unidades) para 5A (pGilda_5A) e 2µl de *Xho*I (20 unidades) para 5B (pGilda_5B). As temperaturas e tempo de incubação se repetiram e após as digestões as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base Lambda DNA/HindIII Marker 2 da Fermentas[®] seguindo para gel extração. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até o uso.

3.6 Ligação

Para a liga o,   necessário haver uma rela o de 1:3 a 1:5 entre a quantidade de moléculas de plasmídeos e de insertos, partindo-se de 50ng de plasmídeo. Duzentas unidades da enzima T₄ DNA ligase (New England BioLabs[®]) foram utilizadas para a rea o de liga o (volume final de 10µl), a qual ocorreu durante 16 horas, a 16°C e por 15min a 65°C (para desativa o da enzima) ao termociclador.

Para determinar esta concentra o, amostras de plasmídeos e de insertos digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo 5µg/mL de brometo de etídio, usando-se indicadores de pesos moleculares com concentra es conhecidas, então as intensidades de banda foram comparadas obtendo-se valores relativos de ng/ l de cada amostra, conhecendo-se o volume aplicado e a diferença entre o tamanho do vetor e dos insertos,   possível determinar o volume de cada soluço que obedeça aos parâmetros para a rea o de liga o.

1 e 2) Vetor – inserto: 50ng do vetor digerido concentrado (pG_5A ou pG_5B); ~11ng do inserto (Sema_5A ou Sema_5B) digerido; 1µl Tampão contendo 10mM de ATP, 0,5µl da enzima T4 ligase (New England BioLabs®); água q.s.p (quantidade suficiente para). 10µl.

3 e 4) Vetor – Vetor: 50ng do vetor digerido (pG_5A ou pG_5B); 1µl de tampão para ligase; 0,5µl da T4 Ligase; água q.s.p. 10µl.

Todas as reações de ligação foram submetidas à 16°C por 16 horas e por 15min a 65°C para inativar a enzima.

Após a reação as amostras foram precipitadas: 1µl da reação foi armazenado, aos 9µl restantes foram adicionados 11µl de água deionizada autoclavada e 2µl de acetato de sódio 3M pH 6,0 e homogeneizado por turbilhonamento ao vortex. Em seguida, foram adicionados 60µl de etanol absoluto, homogeneizado por inversão e transferido para um tubo de 1,5ml. A solução foi incubada por 3 dias, a -20°C. Então, os tubos foram centrifugados a 13.000rpm (~20.200 xg) por 30min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e guardado por segurança. Ao tubo original, foram adicionados 600µl de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000rpm (~20.200 xg) a 4°C por 20 min. Logo em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o DNA precipitado foi seco em uma estufa a 37°C e após a evaporação o precipitado foi ressuspenso em 5µl de água deionizada autoclavada.

Foi também utilizado o método de diálise por membrana para dessalinizar a solução: foi utilizada uma membrana de nitrocelulose (45µm) para cada construção, foram feitas marca de identificação em cada membrana. Em um Becker adicionou-se cerca de 150ml de água destilada deionizada, na superfície da água posicionou-se as membranas com a face brilhosa para cima, no centro de cada membrana adicionou-se 8µl do produto de ligação de acordo com as marcações, os 2µl restantes são guardados por medida de segurança. Após 30min, as gotículas sobre as membranas são retiradas com o auxílio de uma micropipeta, aproximadamente 5,5µl de cada reação foram recuperados.

3.7 Replicação dos Vetores em Bactérias

Os produtos das reações de ligação (1µl) foram eletroporados em bactérias eletrocompetentes DH5α, (40µl), como descrito anteriormente (item 3.4). Após a recuperação sob agitação por 1 hora a 37°C em LB, foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml); inicialmente 100µl foram esgotados com o auxílio da alça de Drigalsky, então o restante foi transferido para um tubo de 1,5ml (Eppendorf®) e centrifugado a 3.500rpm por 2min em uma centrífuga Mini Spin® da Eppendorf®. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em aproximadamente 100µl de LB e foram esgotados em outra placa. As placas ficaram por não mais que 16 horas em estufa a 37°C. Após este período, algumas colônias foram escolhidas para verificação da presença dos insertos.

3.8 PCR de Colônia

Para confirmar a presença do inserto, várias das colônias obtidas foram, cada uma delas, inoculadas em 50µl de caldo LB com ampicilina e 1µl destas suspensões de células foi utilizado como molde em uma reação de PCR (volume final de 10µl) com iniciadores específicos para o fragmento codificador do domínio citoplasmático de Semaforina 5A ou de Semaforina 5B. Foi usado para controle positivo, para Sema_5A cDNA e para Sema_5B, além do cDNA, o plasmídeo pET 28a-CITO (disponível no laboratório) como DNA moldes para a reação. Para controle negativo, colônias transformadas apenas com o pGILDA duplamente digerido e religado foi usado como molde.

Para cada reação foi usado: 1µl de tampão 10x; 1,3mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTP; 0,5mM de cada iniciador específico; 0,5u da enzima Taq polimerase; 1µl de LB com cada colônia. O volume final da reação foi completado para 10 µl de água destilada e deionizada. As condições de reação foram as mesmas usadas anteriormente (ver item 3.3). O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%. Após a separação eletroforética, o gel foi visualizado com auxílio de luz ultravioleta e fotodocumentado (ChemiDoc System- Bio Rad®).

Colônias positivas (com inserto) foram então cultivadas em meio líquido para purificação dos plasmídeos em pequena escala (Miniprep, realizada de acordo com

os fabricantes do kit Qlaprep Spin Miniprep Kit - Qiagen®). Estes foram digeridos e sequenciados para verificação da sequência.

3.9 Transformação em Leveduras

Vários protocolos de transformação foram realizados com o objetivo de se contornar várias dificuldades obtidas com essa técnica. Entre eles, o crescimento de colônias de aspecto morfológico e cheiro não condizente com leveduras. Foram utilizadas diferentes fontes de colônias de levedura para se ter certeza da sua pureza, assim como diferentes alíquotas de plasmídeo repórter. Após várias tentativas, as colônias finalmente cresceram após as transformações.

3.9.1 Acetato de Lítio/PEG *Clontech*

Leveduras da linhagem RFY 206 foram transformadas, utilizando-se o protocolo de acetato de lítio/PEG (*Yeast Protocols Handbook*, **Clontech**, maio 2000), usando o método de co-transformação, onde dois plasmídeos são transformados ao mesmo tempo na reação, bem como transformações únicas e sequenciais.

A partir de algumas colônias frescas (até uma semana), foi feito um pré-inoculo de 50ml em meio líquido YPD (10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona e 20g/L de dextrose) incubado em um agitador (*Queue® Orbital Shaker*) a 30°C por ~18h, 250rpm até a fase estacionária (~ DO₆₀₀ 1-1,5). Após o crescimento, o pré-inoculo foi diluído em 300ml do mesmo meio até a DO₆₀₀ 0,2-0,3 e foi incubado no agitador a 30°C por 3 horas até atingir a DO₆₀₀ 0,4-0,6. Então, todo o inoculo foi sedimentado em uma centrífuga (*Eppendorf® 5810R*) a 1.000xg por 5min à temperatura ambiente. Os sedimentos foram ressuspensos em 50ml de tampão TE (Tris HCl 0,01M, EDTA 1mM pH7,5) estéril e novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi ressuspenso em 1,5ml da solução TE + acetato de lítio 0,1M (LiAc).

Em paralelo, foram preparados os tubos com os plasmídeos para a transformação. Em cada tubo de 1,5ml, foi adicionado 0,1µg de cada plasmídeo a ser transformado e 0,1mg de ssDNA carregador (*herring testes* ou *salmon sperm*). O conteúdo foi misturado e 100µl da suspensão de leveduras em TE+LiAc foi

adicionado a cada tubo, eles foram homogeneizados, e para cada tubo foi adicionado 600µl de PEG (MW 3,700, 40%) + LiAc. Sendo então novamente misturados por 10s e logo em seguida incubados com agitação a 30°C por 30min.

Para transformações únicas ou seqüenciais, adicionou-se somente 0,1µg do plasmídeo de interesse. Para transformações seqüenciais, a levedura inicial já possuía o plasmídeo pSH18-34.

Então foi adicionado 70µl de DMSO em cada tubo, misturando-se gentilmente por inversão após a adição. Cada transformação foi incubada a 42°C em banho Maria por 15 min e em seguida colocada em gelo por 2min. Após o choque térmico, cada transformação foi centrifugada a 14.000rpm por 5s e cada precipitado ressuspenso e 500µl de TE. Cada transformação foi plaqueada utilizando-se 100µl da suspensão não diluída e 100µl da diluição 1:100. Cada transformação foi plaqueada em seu próprio meio seletivo (Glicose SD minimal DO) de acordo com os plasmídeos transformados.

As placas foram incubadas em uma estufa a 30°C por até 5 dias, período no qual se verificou o crescimento de colônias isoladas. Colônias selecionadas aleatoriamente foram repicadas em uma “master plate” com meio de igual constituição.

3.9.2 Eletroporação

Um protocolo diferenciado de transformação de leveduras foi modificado a partir de Simon (1993), que envolve o mesmo procedimento usado em transformações de bactérias por eletroporação.

Leveduras RFY 206 foram inoculadas (a partir de um pré-inóculo) em 100 ml de meio YPD até a DO_{600} 1-1,5. O inóculo foi centrifugado a 2.000xg por 5min a 4°C, e após o descarte do sobrenadante, as colônias foram lavadas em 50ml de tampão de eletroporação (0,3mM Na_2HPO_4 ; 0,2mM KH_2PO_4 ; 10% Glicerol) e novamente centrifugadas (nas mesmas condições anteriores). Em seguida, o sobrenadante foi parcialmente extraído e o precipitado ressuspenso em 1ml. A suspensão foi incubada no gelo por 5min. Para cada transformação foram utilizados 40µl dessa suspensão. Foi adicionado 100ng de plasmídeo por alíquota para cada transformação. A mistura foi incubada no gelo por 20min. e em seguida eletroporado em cubetas de 2mm com as seguintes condições: decaimento exponencial, 1,5kV, 25µF, 200Ω (no eletroporador Bio Rad® Gene Pulser Xcell®).

Após a eletroporação, as leveduras foram ressuspensas em 100µl do tampão de eletroporação e então plaqueadas em meios seletivos, em duas concentrações: não diluído e uma diluição 1:100.

3.9.3 Transformação Rápida

Este protocolo obtido de Woods e Gietz (2001) visa à transformação rápida e simples (não co-transformação) em leveduras a partir de placas ou meio líquido.

Para cada plasmídeo a ser transformado, algumas colônias ($\sim 10^8$ células) RFY 206 já transformadas com o plasmídeo pSH18-34 foram coletadas de placas e colocadas em um tubo de 1,5ml contendo 1ml de água ultra-pura estéril. Foram centrifugadas a 13.000rpm (Mini Spin[®]) por 15 segundos. A água foi removida com uma pipeta e o precipitado foi ressuspenso em 360µl de mistura de transformação (240µL de PEG (50% [v/v]), 36µL de LiAc (1M), 5µL de DNA carreador previamente fervido (20 mg/mL), 100ng de plasmídeo; água ultra-pura estéril para completar um volume final de 360µl) e incubadas a 42°C por 45min. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13.000rpm por 30s e o sobrenadante removido. O precipitado foi ressuspenso com 100µl de água ultra-pura estéril. Cada transformação foi plaqueada utilizando-se 100µl da suspensão não diluída e 100µl da diluição 1:100. Após 2-4 dias as colônias foram repicadas em uma “master-plate”.

3.9.4 Adaptado de Woods e Gietz (2005)

Várias colônias RFY 206 já transformadas com o plasmídeo pSH18-34 foram inoculadas em um pré-inoculo de 25ml com meio seletivo SD Gli -Ura. Essa cultura foi incubada em um shaker a 30°C a 240rpm até atingir uma $DO_{600} \sim 0,8$, então foi transferida para um inoculo de 200ml de meio seletivo e incubadas novamente no shaker por 3 horas. A cultura foi precipitada a 2.500rpm por 5min à temperatura ambiente. O meio foi descartado e o precipitado foi lavado e centrifugado em água ultra-pura estéril com o mesmo volume de meio (GIETZ; WOODS, 2006).

O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso e lavado em 50ml de acetato de lítio (LiAc) 0,1M juntando-se as suspensões em um só tubo. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso em LiAc 0,1M até um volume final de 1mL. 500µL da suspensão de células foi misturado com a solução TRAF0 (0,750µL de LiAc 1M; 4mg de ssDNA; H₂O q.s.p.. 2,5mL). Desta mistura, colônias + TRAF0, foram usados 50µL por transformação.

Para cada transformação, aproximadamente 100ng de plasmídeo foram adicionados, os tubos foram agitados por 2min, então acrescentou-se 100µL de 50% PEG 3350.

Os tubos foram incubados a 42°C por 40min a 200rpm, logo em seguida as leveduras foram sedimentadas a 2.500rpm por 5min. Finalmente o precipitado foi ressuspensão em 100µl de água ultra-pura estéril e plaqueados (sem diluir ou na diluição de 1:100) em meio seletivo SD Glicose –His –Ura. Após 2-4 dias as colônias forma repicadas em uma “master-plate”.

3.10 Ensaios para verificação das iscas

3.10.1 Ensaio de auto-ativação

As colônias da “master plate” foram repicadas em placas SD Glicose e SD Galactose/raffinose, ambas –His –Ura contendo 80µg/ml de X-Gal e tampão BU 1X (tampão BU 10x: 70g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30g/L de NaH_2PO_4 , ajustar para pH7 e autoclavar), e foram incubadas a 30°C por até 5 dias. As placas foram analisadas a cada 24 horas para verificar o crescimento e o desenvolvimento da cor azul das colônias.

3.10.2 Ensaio de expressão

Para o ensaio de expressão, as colônias da “master plate” foram incubadas em 5ml meio líquido Glicose –His –Ura até $\text{DO}_{600} = 1$. Após o crescimento, 1,5ml da cultura foi coletado e reservado como “Não induzido”. O restante da cultura foi centrifugado a 1.000 xg por 7 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com meio líquido Galactose/Raffinose –His –Ura. Após as lavagens as leveduras foram ressuspensas em 5ml de Galactose/Raffinose –His –Ura e incubadas a 30°C por 4 – 16 horas para indução da expressão das proteínas de interesse (iscas). As culturas foram sedimentadas a 13.000 xg por 5 segundos. O sobrenadante foi descartado e utilizando-se 20µl de PBS e 20µl de tampão de amostra redutor para SDS-PAGE, o precipitado foi ressuspensão e fervido por 20 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 xg por 5 segundos e o sobrenadante aplicado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e separado em corrida eletroforética (15mA-20mA).

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através de transferência no equipamento Trans-Blot SD™ (Bio-Rad®) (para transferência *semi-dry*) por 1 hora a 20mA. A membrana foi lavada uma vez com TBST (150mM NaCl; 50mM de Tris-HCl pH7,4 e 0,05% de Tween20) e incubada com TBST contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico®) por 1 hora. Foi então incubado com o anticorpo primário anti- LexA em concentração de 1:500 por 16-18 horas a 4°C em uma gangorra. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos cada com TBST e incubada com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com HRP (horseradish peroxidase Sigma®) 1:2000 por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com TBST (5 minutos por cada lavagem) e revelada.

Para revelar a membrana foi utilizado o kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific®) de acordo com as instruções do fabricante. Filmes de auto-radiograma Amersham® Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare®) foram exposto à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

3.11 Biblioteca de Epitélio Olfatório

Para a realização da varredura através de “mating”, foi utilizada uma biblioteca de epitélio olfatório (EO) construída pela Profª Drª Adriana Frohlich Mercadante. Esta biblioteca foi produzida a partir de cDNA de epitélio olfatório de camundongos.

Varreduras dessa biblioteca com diferentes iscas foram realizadas e atestaram que a representatividade das mensagens do epitélio olfatório foi mantida na biblioteca em questão (DANNECKER, VON et al., 2005). Essa biblioteca de cDNA possui cerca de 10^6 clones independentes, com insertos de tamanho de 300-4000 pares de bases (média de 0,7 Kb). Brevemente, epitélios olfatórios de camundongos foram isolados e os mRNAs poli (A)+ desse tecido foram obtidos com a ajuda do kit "Poly A Quick Kit" (Stratagene®). A síntese do cDNA foi feita usando-se oligonucleotídeos dT (kit "Superscript Choice System for cDNA Synthesis"- Gibco/BRL®). Adaptadores permitiram a inserção dos cDNAs nos sítios Eco RI e Xho

I do vetor pJG4-5. Os passos seguintes de transformação da biblioteca em bactéria e depois em levedura (EGY 48) foram feitos com descrito previamente (em AUSUBEL *et al.*, 1999). Essa biblioteca pré-transformada foi congelada em várias alíquotas e, dessa forma, essa abordagem permite várias varreduras, com diferentes iscas, de uma biblioteca transformada uma única vez com alta eficiência na levedura. Assim é possível economizar tempo e material nesse passo da transformação, que normalmente é crítico e limitante.

Antes do “mating” é necessário realizar testes de viabilidade das alíquotas de biblioteca congeladas a serem utilizadas.

Uma série de diluições da alíquota foi realizada, de 10^{-2} a 10^{-7} , cada uma com volume final de 200µl. Em placas de meio SD glicose -Trp, foram esgotados 100µl das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e as colônias, após crescimento, foram contadas. A partir desse valor, é conhecido o volume necessário para realizar o “mating”, onde é preciso utilizar no mínimo 10x mais células em relação ao tamanho da biblioteca. (CLONTECH, 2000).

O mesmo procedimento foi aplicado para as leveduras EGY 48 transformadas com plasmídeo pJG4-5 vazio. Estas leveduras são usadas como controle durante a varredura e devem ser quantificadas para que se use o mesmo número de células que será usado da biblioteca.

3.12 Varredura da biblioteca através de “mating”

Para realizar o estudo de interações de proteína através do sistema de duplo-híbrido é necessário ter os plasmídeos da isca, da biblioteca e do gene repórter em uma mesma célula. Tanto o plasmídeo da isca, o pGILDA quanto o plasmídeo repórter pSH18-34 foram transformados na levedura RFY206 (MATa) enquanto que os plasmídeos pJG4-5 que portam a biblioteca de EO estão na levedura EGY48 (MATα). As leveduras são submetidas a um processo de cruzamento (“mating”), onde as duas linhagens se combinam em uma célula diplóide, compartilhando também seus plasmídeos.

Foram coletadas aproximadamente 5 colônias da “master plate” da levedura RFY 206 transformada contendo tanto o plasmídeo repórter como a isca. Estas colônias foram inoculadas em 10ml do meio SD glicose -His -Ura e incubadas a 30°C, sob agitação durante a noite. Então, o inoculo foi diluído até a DO_{600} de 0,2 com a adição de SD glicose -His -Ura e foi incubado até chegar a uma DO_{600} de ~1,5. A cultura foi sedimentada centrifugando-se a 1500 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com água destilada estéril até um volume final de 1ml.

Foram realizados dois cruzamentos por isca: Isca + Controle (EGY 48 transformada com pJG4-5); Isca + Biblioteca.

Foi utilizado 200 μ l da isca do passo acima, para cada cruzamento. Para o cruzamento com a biblioteca de epitélio olfatório, foi utilizado 6×10^7 cfu, e a mesma quantidade da levedura controle.

As duas linhagens foram misturadas e centrifugadas a 1.500 xg por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 200 μ l meio YPD. Cada suspensão de 200 μ L foi esgotada em uma placa de meio sólido YPD e incubada por 12-16 horas a 30°C.

Após a incubação, o tapete de células formado foi raspado com um raspador de células (Corning®) após a adição de 1ml do meio SD Gal/Raff -Ura -His -Trp. Todo o raspado foi encubado em 100ml do mesmo meio e as colônias foram induzidas por 6 horas, a 30° C, sob agitação.

Após a indução, todos os cruzamentos foram centrifugados (em tubos Falcon® 50ml) a 1.500 xg por 5min. Os precipitados foram lavados com 30ml de água estéril, e novamente centrifugados. Os precipitados foram então ressuspensos e diluídos até que a suspensão chegasse a DO_{600} de 5,0, representando 10^8 células por ml.

Para cada cruzamento, foram feitas diluições seriadas de 300 μ l cada uma (de 10^{-1} a 10^{-6}). A partir dessas diluições, foram feitas as seguintes placas:

- 100 μ l de cada diluição e da suspensão não diluída dos cruzamentos isca + controle e isca + biblioteca em placas Gal/Raff -Ura -His -Trp -Leu;
- 100 μ l das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em placas SD Gal/Raff -Ura -His -Trp, (+LEU) tanto as com controle como as da biblioteca;

- 100µl por placa do cruzamento isca + biblioteca sem diluir em 20 placas SD Gal/Raff -Ura -His -Trp -Leu.

3.13 Potencial de Transativação

O gene LEU2, que possibilita a levedura crescer em um meio sem leucina, está sob a influencia do promotor LexA. Este gene está presente no cromossomo da levedura EGY48, e é ativado somente onde existe a presença do domínio de ligação ao DNA LexA e a aproximação de algum domínio ativador. Portanto este gene só deveria ser ativado, e consequentemente permitir o crescimento da levedura em um meio livre de leucina, apenas nas células diplóides onde ocorreu alguma interação da isca com a mensagem (biblioteca) do plasmídeo pJG4-5. O potencial de transativação é a capacidade que as leveduras cruzadas têm de crescerem em meio sem leucina, sem que exista uma interação entre o produto do pGILDA e o produto do pJG4-5.

Para calcular este potencial, o cruzamento isca + controle é utilizado, onde o número de colônias encontrado na placa SD Gal/Raff -His -Trp -Ura (+Leu) é dividido pelo número de colônias encontrado na placa SD Gal/Raff -His -Trp -Ura -Leu e multiplicado pelo tamanho da biblioteca. O resultado final é o numero mínimo recomendado de colônias a serem selecionadas das 20 placas do cruzamento isca + biblioteca.

3.14 Seleção de Colônias Candidatas

A partir do cálculo do potencial de transativação, foram selecionadas ~100 colônias, 5 de cada placa do cruzamento pGi_5B (isca) + biblioteca. Dois tipos de colônias foram selecionadas: colônias com menos de 1mm (P-pequena) e colônias com mais de 1,5mm (G-grande). As colônias foram repicadas em duas placas “master plate” SD Gal -His -Trp -Ura (+Leu), e incubadas a 30°C por dois dias. Estas “master plates” serviram como molde para “carimbar” outras quatro placas:

- SD Gli -His -Trp -Ura -Leu;

- SD Gli X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu);
- SD Gal -His -Trp -Ura -Leu ;
- SD Gal X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu).

Para carimbar, transferindo as colônias da “master plate” para as outras placas, a placa “master” foi pressionada sobre um pedaço de veludo estéril apoiado sobre um disco rígido de mesmo diâmetro que a abertura interna de uma placa de petri. Em seguida as outras placas foram pressionadas uma a uma sobre esse tecido. As placas foram incubadas na estufa a 30° C, acompanhadas e fotografadas a cada 24h até 96h (4 dias). A seleção de colônias com interações positivas seguiu os seguintes critérios apresentados na **quadro 1**:

Placa	Característica
SD Gli -His -Trp -Ura -Leu	Ausência ou pouco crescimento
SD Gli X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)	Coloração branca até 72H
SD Gal —His -Trp -Ura -Leu	Crescimento
SD Gal X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)	Coloração azul

Quadro 1: Relação das características das colônias positivas para seleção. Estas características ocorrem devido a atuação de 2 repórteres. A indução ocorre por galactose, expressando as proteínas de fusão Isca + Lex-A (BD) e Biblioteca + B42 (AD). A aproximação dos domínios BD e AD por interação entre isca + biblioteca, induz a expressão do gene LacZ, provocando a cor azulada em meio enriquecido com X-Gal, e do gene LEU2, permitindo a sobrevivência da colônia em meio sem leucina.

3.15 PCR de Colônia – Leveduras (Piloto)

As colônias positivas foram raspadas a partir da “master plate” e suspensas em 50µl de água Mili-Q® estéril. Em seguida foram vigorosamente agitadas (vortexadas) e aquecidas a 96° C por 20 min. Cinco microlitros desse preparado foram usados como molde em uma reação de PCR contendo tampão ótimo para Taq 1x, 1mM MgCl₂, 2pM dNTP, 0,4mM de iniciadores, 0,3U *Taq* DNA polimerase em uma reação com 25µl de volume final. Os iniciadores utilizados flanqueiam a região de policlonagem do plasmídeo pJG4-5 e permitem amplificar a partir do plasmídeo vazio, um produto de 125 pb.

Iniciadores:

- Iniciador *forward* para o plasmídeo pJG4-5 que anela a 42bp da região de clonagem; Tm: 62°C, CG: 61%, 18mer.

5' CTG AGT GGA GAT GCC TCC 3'

- Iniciador *reverse* para o plasmídeo pJG4-5 que anela a 62bp da região policlonal; Tm: 57°C, CG:53%, 17mer.

5' GCC GAC AAC CTT GAT TG 3'

A reação foi realizada a:

95°C – 2min; 2 ciclos de 95°C – 4min, 50°C – 1min, 72°C – 3min; 40 ciclos de 95°C – 30s, 50°C – 30s, 72°C – 30s + 1s por ciclo; e uma extensão final a 72°C – 10min

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.16 Lise de Leveduras e Extração de DNA Plasmidial

Este método foi utilizado para purificar DNA plasmidial diretamente de culturas líquidas de leveduras. O DNA purificado pode ser aplicado em reações de PCR, eletroporação, digestões enzimáticas entre outros. O método adaptado do manual do usuário da ORIGENE, 2008 deriva do método de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979), utilizando esferas (*beads*) de vidro lavadas em ácido para romper a parede celular das leveduras, sem a necessidade de utilização de enzimas.

3.16.1 *Beads* de vidro – Lavagem Ácida

Foram utilizados 2 tamanhos diferentes de *beads* de vidro em reações de lise distintas, entre 150 e 212µm de diâmetro e *beads* de ~2mm de diâmetro. Foram utilizados os dois tamanhos para verificar qual lise obteria o melhor resultado, uma vez que o recomendado pelo protocolo seria o uso de *beads* pré-lavados em ácido de 400µm de diâmetro (Sigma® 8772). Segundo o manual é usado 300mg de *beads*

por lise. As quantidades suficientes de *beads* para as lises foram pesadas e colocadas em tubos cônicos de 15ml. Foi adicionado HCl 5,8M em um volume 3x maior que os ocupados pelos *beads* e incubados por 1 hora. O ácido foi removido e os *beads* foram lavados 10x com água destilada, adicionando-se 3x o volume de *beads* de água, agitando e descartando-a. Após as lavagens, toda a água foi retirada e os *beads* autoclavados por 20 minutos e em seguida secos em estufa de secagem a 65°C durante a noite.

3.16.2 Lise

Foram raspadas 3 colônias de leveduras e inoculadas em 2ml de meio SD Glicose –His –Ura –Trp a 30° com agitação por 16-18 horas. As colônias foram sedimentadas por centrifugação a 1.500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso no volume residual e transferido para um tubo de 1,5ml. Foi adicionado 200µl da solução *plasmid rescue* (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 0,1M; Tris pH8 0,01M; EDTA 0,001M). Em seguida foi adicionado 100µl de fenol Tris saturado pH8,0 e 100µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Foi adicionado então 300mg dos *beads* lavados em cada lise. Os tubos foram agitados a baixa velocidade por 4 minutos e em seguida centrifugados a 10.000 xg por 5 minutos. 200µl do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 1,5ml.

3.16.3 Precipitação de DNA Plasmidial

Foi adicionado 20µl de acetato de sódio 3M autoclavado, ao tubo de 1,5ml contendo 200µl do sobrenadante resultante da lise. O tubo foi vigorosamente agitado e em seguida adicionou-se 400µl de etanol 95% (Merck®) e novamente agitado. O tubo então foi centrifugado a 10.000 xg por 20 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo lavadas com etanol 70% (Merck®) gelado. O Sobrenadante foi removido e o tubo foi colocado aberto de cabeça para baixo em uma estufa a 37°C por 15 minutos. A parede do tubo foi lavada e o precipitado ressuspenso com 5µl de água pura.

3.17 Eletroporação e PCR de Colônia – DH5α

Os plasmídeos purificados foram eletroporados em bactérias *Escherichia coli* - DH5 α e após crescimento em meio LB contendo 100 μ g/ml de ampicilina, foram escolhidas 6 colônias de cada transformação para realização de PCR de colônia. É preciso escolher no mínimo 3 colônias de bactérias para que ao menos uma delas contenha o plasmídeo pJG4-5, uma vez que a levedura lisada possuía 3 plasmídeos em seu citoplasma: pGILDA (isca); pSH18-34 (repórter) e pJG4-5 (biblioteca). Todos contendo o gene de resistência para ampicilina.

As colônias selecionadas foram repicadas em “master plate” e inoculadas em um tubo de reação para PCR de 0,2ml servindo como molde para reação. Em um volume final de 15 μ l foi adicionado: Tampão *Taq* 1x, dNTP 0,2mM; MgCl₂ 1,33mM; 2pmol de Primer para pJG4-5 e 0,3U de *Taq*. DNA polimerase. A reação foi submetida a 95°C – 10min; e 35 ciclos de 95°C – 40s; 49°C - 50s; 72°C – 1min e 10s; finalizando com uma extensão a 72°C por 7min.

3.18 Sequenciamento de Nucleotídeos

Foram feitas preparações de plasmídeos em pequena escala (mini-preps) a partir das colônias de bactérias que apresentaram resultado positivo na PCR, e em seguida, foram realizadas reações de sequenciamento de nucleotídeos. Dois protocolos foram utilizados:

- 2 μ l BigDye 3.1; 3 μ l BigDye[®] Terminator[®] v1.1/3.1 *Sequencing Buffer* (5X) (tampão BD 5x); 4pmol iniciador; 300ng dsDNA (molde) em um volume final de 20 μ l.
- 1 μ l BigDye; 1,5 μ l tampão BD 5x; 5pmol iniciador; 300ng dsDNA (molde); em um volume final de 10 μ l.

Tanto o iniciador *forward* como o iniciador reverso para pJG4-5 foram utilizados. A reação foi submetida a 96°C por 2min e 35 ciclos de 96°C 15s, 48°C 15s, 60°C 4min.

Após a reação, as amostras foram precipitadas, adicionando-se 0,1V (V= volume final da reação de sequenciamento) de acetato de sódio 1,5M/ EDTA 0,25M e 3V de etanol 100% (Merck[®]), a reação foi então transferida para um tubo de 1,5ml e homogeneizada gentilmente. Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos e

então centrifugados por 20 minutos a 20.000 $\times g$ a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 15 μ l de etanol 70% gelado (Merck®) e novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o tubo seco em estufa a 37°C por uma hora. AS reações foram mantidas a -20°C até serem aplicadas no sequenciador. Dez microlitros de formamida HI DI foram adicionados às amostras e então incubadas por 5 minutos a 95°C e colocadas no gelo, logo antes da corrida. Foram utilizados os seqüenciadores Applied Biosystems® ABI 3500 e 3130 e o cromatograma visualizado no BioEdit® v.7.0.9.0.

4. RESULTADOS

4.1 Desenho de Iniciadores

Durante o desenho dos iniciadores, foi levada em consideração a necessidade de colocação de sequências reconhecidas por enzimas de corte (sítios de restrição) diferentes para cada iniciador *forward* (F) e *reverse* (R) para que houvesse uma inserção direcionada no plasmídeo. Tanto o plasmídeo como as sequências codificadoras de ambos os domínios foram analisadas quanto a ocorrência dos sítios de restrição e após a consulta ao mapa do plasmídeo e verificação dos sítios existentes nos insertos através da ferramenta eletrônica NebCutter (NEBcutter V2.0), foram escolhidas as enzimas *EcoRI* e *BamHI* para os iniciadores Sema-Cito_5A_pG_F e R e *BamHI* e *XhoI* para Sema-Cito_5B_pG_F e R.

Felizmente, foi possível desenhar os iniciadores tanto F quanto R para ambos os insertos abrangendo as extremidades das sequências. Ou seja, a porção citoplasmática está totalmente flanqueada pelos iniciadores, foram feitos ajustes mudando o número de pares de base de cada iniciador, para manter o ΔT_m próximo a 0 e a quantidade adequada de C e G (50%).

Para o desenho dos iniciadores também foi levada em conta a manutenção da fase aberta de leitura dos insertos, já que eles são clonados após uma sequência do vetor pGILDA que codifica para o domínio de ligação ao DNA, LexA. Assim, quando essa construção for expressa na levedura, durante o ensaio de duplo-híbrido, ela irá produzir os domínios de interesse em fusão com o LexA na região N-terminal.

Iniciadores:

- Sema-Cito_5A_pG_F

5' CGG AAT TCT ACA CCT ACT GCC AGA GGT AC 3'

Iniciador *Forward* para a porção citoplasmática da Sema5A, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *EcoRI* na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto. 29 mer; T_m: 61,2°C; CG= 51,7%.

- Sema-Cito_5A_pG_R

5' CGG GAT CCC TAG TAT TCA TCA TAA TTG TTG AG 3'

Iniciador *Reverse* para a porção citoplasmática da Sema5A, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Bam*HI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto. 32 mer; Tm: 58,2°C; CG= 40,6%.

- Sema-Cito_5B_pG_F

5' CGG GAT CCA ATC TTG CCA GCA CTG CCA G 3'

Iniciador *Forward* para a porção citoplasmática da Sema5B, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Bam*HI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto. 28 bp. Neste iniciador foram colocadas 2 pares de base a mais (em cinza) depois da sequência de reconhecimento da enzima de restrição para manutenção da fase aberta de leitura do domínio de interesse com o domínio LexA (presente no pGilda) após a inserção do fragmento no plasmídeo.

28 mer; Tm: 66,5°C; CG= 60,7%.

- Sema-Cito_5B_pG_R

5' CCG CTC GAG TCA GCT GTT GGG GAA ACA GC 3'

Iniciador *Reverse* para a porção citoplasmática da Sema5B, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Xho*I na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto.

29 mer; Tm: 67,5°C; CG= 62%.

4.2 Obtenção de Insertos

Assim que os iniciadores encomendados chegaram, foi realizada uma PCR piloto para determinar as condições de reação a serem usadas. Elas foram estabelecidas de acordo com os protocolos já usados com sucesso no laboratório, modificando-se apenas a temperatura de anelamento de acordo com a particularidade de cada par de iniciadores. Após a reação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% juntamente com o

marcador de pares de base O'GeneRuller 100bp da Fermentas® (**Fig. 7**) As bandas nas alturas esperadas foram identificadas: Sema_5A: 267 pares de base; Sema_5B: 303 pares de base. Os controles negativos da reação foram obtidos omitindo os moldes de DNA dos tubos de reação para PCR. A corrida sofreu distorção fazendo com que a altura do marcador não possa ser correlacionada a todo o gel.

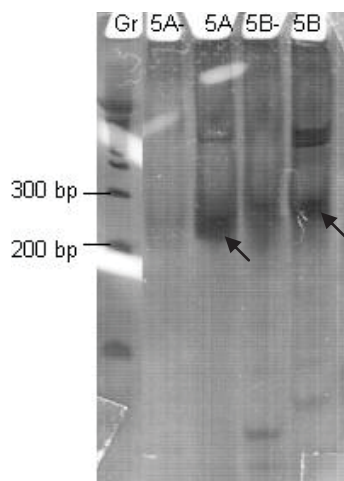


Figura 7: PCR piloto para estabelecer condições de corrida utilizando-se os novos iniciadores.

Lanes: **GR**: Gene Ruller 50 bp; **5A-**: Controle negativo para 5A, reação sem DNA; **5A**: Reação com os iniciadores para Sema_5A e cDNA; **5B-**: Controle negativo para 5B, reação sem DNA; **5B**: Reação com os iniciadores para Sema_5B e o plasmídeo pET28a-CITO. Setas indicam as bandas esperadas, correspondentes aos insertos de interesse.

Com a verificação do sucesso da PCR piloto em obter produtos de reação na altura de banda esperada (**Fig. 7**), seguiu-se para as PCRs de larga escala, de acordo com o protocolo estabelecido acima, para a obtenção de grandes quantidades de insertos, necessárias para as construções desejadas (**Figs. 8 e 9**).

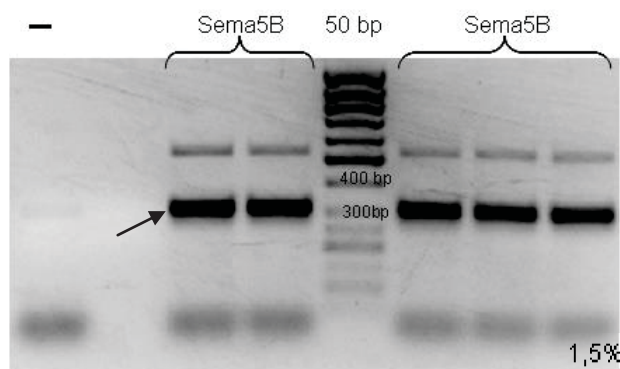


Figura 8: PCR em larga escala para produção de insertos para Sema_5B contendo sítios de restrição para *Bam*HI e *Xho*I. Lanes: -: Controle negativo; **Sema5B**: Fragmentos da PCR de larga escala para obtenção de insertos de Sema_5B a serem gel-extraídos; **50 bp**: Marcador de massa de 50bp. Seta indica as bandas extraídas.

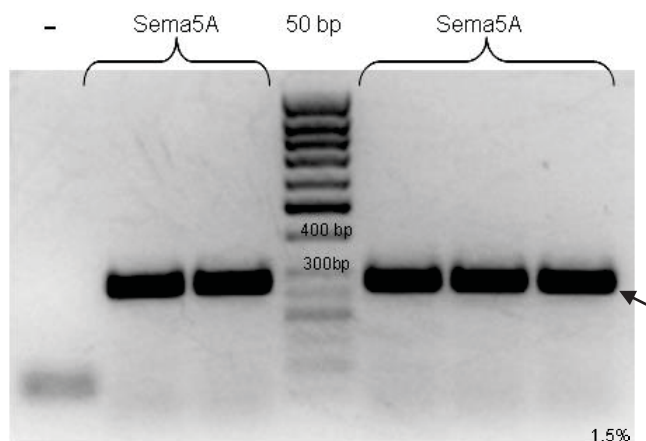


Figura 9: PCR em larga escala para produção de insertos para Sema_5A contendo sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI. Lanes: -: Controle negativo; **Sema5A**: Fragmentos da PCR de larga escala para obtenção de insertos de Sema_5A a serem gel extraídos; **50 bp**: Marcador de massa de 50bp. Seta indica as bandas extraídas.

Na **figura 8** observa-se a presença de uma banda extra, de aproximadamente 550 pares de base, de origem desconhecida, tal fragmento foi excluído da gel-extração.

As bandas de interesse foram extraídas do gel e purificadas com o kit PerfectPrep Gel CleanUp da Eppendorf® obtendo-se um volume final de 60µl para cada inserto.

4.3 Digestões

Como já foi comentada, a escolha de se usar duas enzimas diferentes para cortar tanto as extremidades dos insertos, quanto a região de policlonagem do vetor, foi feita para que houvesse uma inserção de forma direcionada, isto é, a orientação 5'-3' correta para a síntese protéica dos domínios das Semas fosse mantida no momento em que houvesse a ligação dos insertos ao vetor.

Para digerir o vetor foi necessário fazer a digestão de cada enzima separadamente devido à proximidade dos sítios de restrição usados (**Fig. 10**).

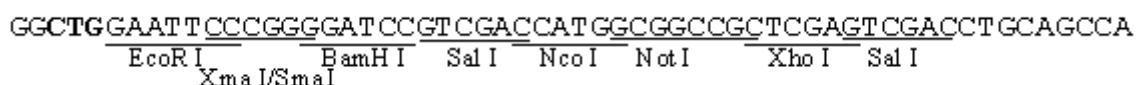


Figura 10: Região de policlonagem do plasmídeo pGILDA representando os sítios de restrição únicos existentes.

Após a digestão, as amostras foram aplicadas em gel de agarose contendo brometo de etídio e submetidas à eletroforese.

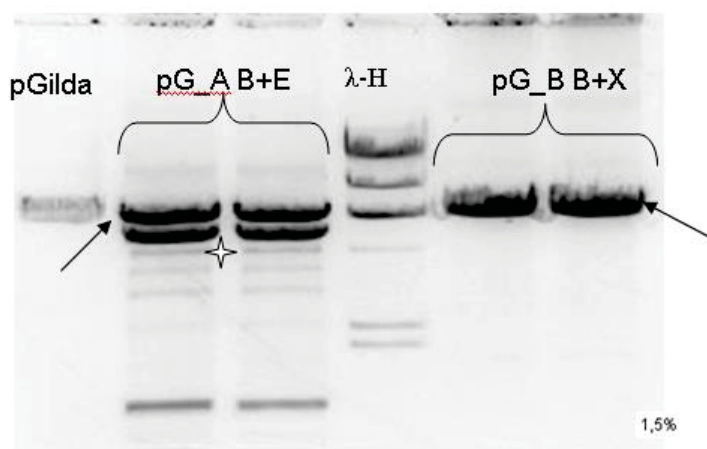


Figura 11: Digestão dupla dos plasmídeos. Lanes: **Bam + Eco**: Dupla digestão do pGILDA com enzimas para prepará-lo para o inserto 5A: “pG_5A”; **λ Hind**: Marcador de pares de base; **Bam + Xho**: Dupla digestão do pGILDA com enzimas para prepará-lo para o inserto 5B: “pG_5B”. **Setas** indicam as bandas extraídas na altura correspondente à 6560bp. **Estrela** indica a banda da forma *super-coiled* do plasmídeo não digerido.

No plasmídeo preparado para receber a Sema_5A foi observado a presença de várias bandas extras. Provavelmente se deve não só à forma *super-coiled* do plasmídeo que não foi totalmente digerido, mas também, à *star activity* da enzima EcoRI (pode-se observar várias bandas de tamanhos menores). Apenas a banda superior seguiu para a gel-extração. (**Fig. 11**)

A dupla digestão dos insertos foi feita com ambas as enzimas ao mesmo tempo, e resultou em bandas na altura esperada (267pb para Sema_5A e 303pb para Sema_5B) (**Fig. 12**). Os insertos foram então extraídos do gel fornecendo uma grande quantidade de fragmentos com pontas coesivas para futuras ligações.

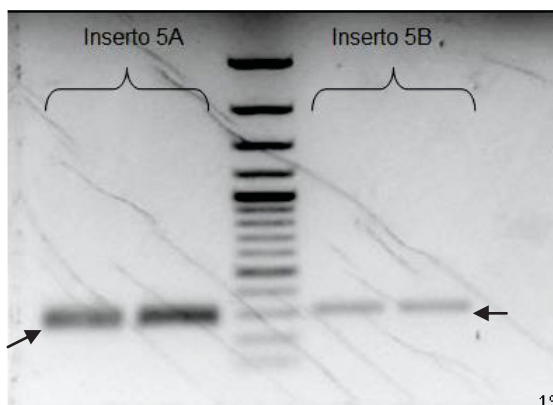


Figura 12: Insertos duplamente digeridos. Lanes: **Sema5A**: Insertos da Sema_5A duplamente digeridos; **50bp**: Marcador de pares de base Gene Ruller 50bp; **Sema5B**: Insertos da Sema_5B duplamente digeridos. **Setas** indicam as bandas extraídas próximas à altura de 300 pares de base.

4.4 Quantificação, Ligação e Transformação

É preciso obedecer a uma relação entre o número de moléculas de inserto com o de moléculas de plasmídeos para obter um sucesso maior na reação de ligação (normalmente deve-se colocar cinco vezes mais insertos do que vetores). Além disso, para uma reação de ligação costuma-se usar 50ng de plasmídeo e o volume final da reação deve ser o menor possível (5-20ul) para manter concentradas as moléculas que serão ligadas.

Após a ligação, as reações foram precipitadas para obtenção do DNA livre de sal, pronta para eletroporação.

Após a eletroporação, foi observado o crescimento de inúmeras colônias, as quais foram averiguadas quanto à presença dos insertos de interesse através de PCR de colônia.

4.5 PCR de Colônia.

O resultado da PCR de colônias permitiu a identificação de vários clones positivos (que apresentavam o vetor com o inserto de interesse). O resultado da **figura 13** indicou 5 colônias para a construção pGi_5A e 6 colônias para a construção pGi_5B. Algumas colônias foram escolhidas e repicadas em 5ml de meio líquido com antibiótico para o protocolo de purificação de plasmídeo em pequena escala.

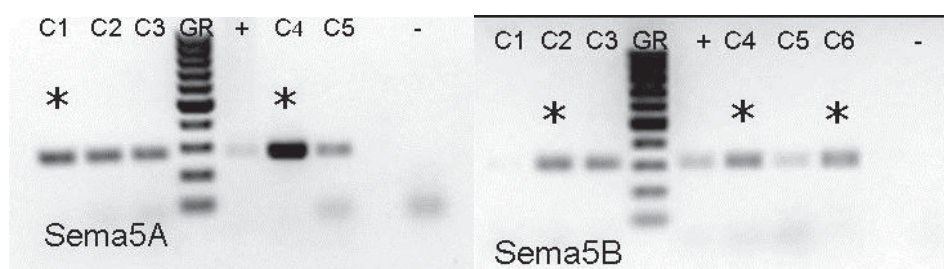


Figura 13: PCR de colônia. Gel Sema5A: Colônias contendo a construção pGi_5A; **GR:** Marcador Gene Ruller 100bp; **+**: Reação com cDNA; **-:** Controle negativo com colônias transformadas com pG_5A. **Gel Sema5B:** colônias contendo a construção pGi_5B; **GR:** Marcador Gene Ruller 100bp; **+**: Reação com pET28a-CITO; **-:** Controle negativo com colônias transformadas com pG_5B. *****: indicam colônias que foram escolhidas para purificação dos plasmídeos.

4.6 Preparação de Plasmídeo em Pequena Escala e Sequenciamento.

A partir da confirmação obtida pela PCR de colônia, algumas foram escolhidas para a produção em pequena escala de plasmídeos purificados. Foram inoculadas em 5ml de meio com antibiótico as colônias C1 e C4 para a Sema_5A e as colônias C2, C4 e C6 para a Sema_5B. Após o crescimento, foi utilizado o kit Qlaprep spin miniprep kit da Qiagen® para obtenção e purificação dos plasmídeos. A purificação foi revisada em gel de agarose (**Fig. 14**) e quantificada em NanoDrop® - Thermo Scientific®.

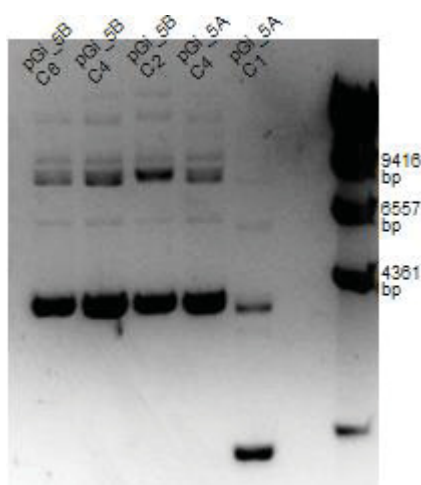


Figura 14: Purificação dos plasmídeos: Resultado da preparação realizada com as colônias escolhidas. As colônias **pGi_5A C4** e **pGi_5B C4** foram escolhidas para aplicações posteriores devido à sua concentração ser maior.

Os plasmídeos foram então linearizados e digeridos e, em paralelo, uma colônia de cada construção foi escolhida para ser seqüenciada utilizando-se iniciadores do pGilda, e assim verificar a correta inserção da seqüência no vetor.

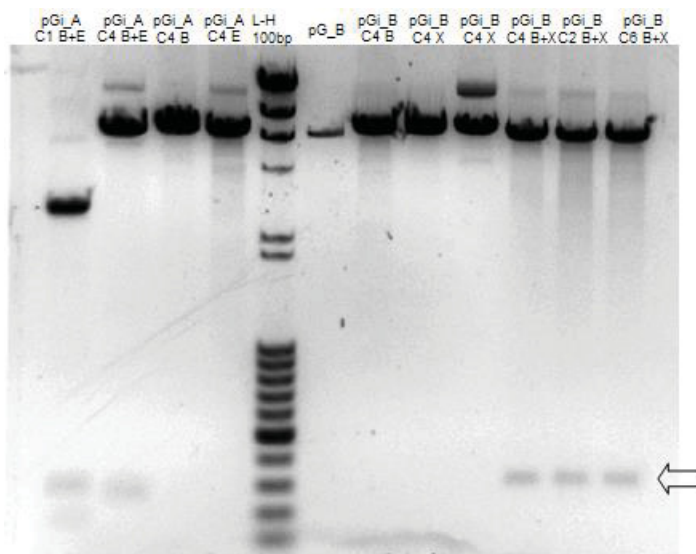


Figura 14: DIGESTÕES DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS: Plasmídeos foram digeridos para verificar o tamanho dos vetores purificados e para observar a liberação dos insertos, a letra **B** representa a enzima *Bam*HI, a letra **E** a *Eco*RI e a letra **X** a *Xho*I. A **flecha** indica a altura esperada dos insertos, aproximadamente 300bp. **pG_B:** pGilda duplamente digerido com *Bam* e *Xho*, depois de purificado, usado como controle de altura para plasmídeo vazio.

As colônias C4, tanto da construção pGi_5A e pGi_5B foram enviadas para sequenciamento em São Paulo (Instituto Ludwig), para verificar a correta ligação dos insertos, observando a manutenção da fase aberta de leitura bem como a não ocorrência de mutações. (dados não mostrados). Após a confirmação das construções, os vetores foram transformados em leveduras.

4.7 Transformação em Leveduras

As linhagens originais de RFY 206 foram transformadas com o plasmídeo pSH18-34 (plasmídeo repórter) ou co-transformadas como o pSH18-34 e com o restante dos plasmídeos (pGi_5A, pGi_5B, pSH17-4, pRHFM1 e pGILDA), inicialmente, através do protocolo de acetato de lítio/PEG da *Clontech* (2000), porém devido a problemas encontrados, vários protocolos foram utilizados.

Presumivelmente, após 4 dias de incubação das placas em estufa a 30°C todas as colônias presentes poderiam ser consideradas como positivas para cada plasmídeo, sendo submetidas à validação de auto-ativação e expressão.

O plasmídeo pSH17-4 é usado como controle positivo no ensaio de auto-ativação, pois sintetiza o BD (Domínio de ligação ao DNA) LexA em fusão com o AD (Domínio de ativação) GAL4; o pRHFM1 é usado como controle negativo no ensaio

de auto-ativação, sintetizando LexA em fusão com a proteína Bicoide, que não funciona como AD (CLONTECH, 2000); o pGilda é usado como padrão vazio no ensaio de expressão.

Após as transformações, várias colônias foram obtidas, porém o teste de auto-ativação apresentou resultado positivo para todas as construções: todas as colônias ficaram azuis após 2 dias. Enquanto que no teste de expressão não foi possível detectar qualquer expressão protéica (não mostrado). Assim, iniciou-se a suspeita de que as colônias obtidas não se tratavam de transformantes com os plasmídeos de interesse, mas talvez de leveduras contaminantes.

Os plasmídeos transformados foram verificados quanto a sua pureza para mitigar qualquer contaminação que pudesse justificar os resultados, todos os plasmídeos, exceto o pSH18-34, estavam puros (contaminação identificada por ensaios de restrição – dados não mostrados). Uma nova alíquota do plasmídeo foi requisitada e novos testes foram feitos para comprovar sua pureza. A levedura RFY206 também foi avaliada quanto ao crescimento em meio seletivo, apresentando crescimento em meio –Ura (dados não mostrados).

Após a chegada de novas alíquotas de leveduras RFY 206 advindas do laboratório da Profa. Dra. Bettina Malnic (IQ-USP), novas transformações foram realizadas porem com os mesmos resultados.

Então, o método de transformação foi modificado. Usou-se o método por eletroporação e o método de transformação rápida. Em ambos não houve o crescimento de colônias viáveis em meio seletivo. Então, novas leveduras RFY206 já transformadas com o plasmídeo repórter pSH18-34 foram recebidas do mesmo laboratório. A partir dessa linhagem, novas transformações com os plasmídeos controles e de iscas foram realizadas, porem novamente, em todos os métodos de transformação testados, nenhuma colônia cresceu em meio seletivo.

Então uma nova tentativa foi feita em parceria com o ICC (Instituto Carlos Chagas, PR), através do pesquisador Henrique Preti (doutorando orientado pelo Prof Dr. Christian Probst), onde um novo protocolo de transformação foi usado. Foram realizadas transformações utilizando-se meios de cultura preparados tanto em nosso laboratório quanto no ICC (preparado com reagentes do ICC). Houve crescimento em meio líquido de ambas as fontes, porem, após a transformação, houve crescimento apenas nas placas feitas com reagentes do ICC, enquanto que nas placas feitas em nosso laboratório não houve crescimento de nenhuma colônia. Foi

observado que para a confecção do meio de cultura no ICC, os aminoácidos eram adicionados após a autoclavação do meio, devido principalmente ao fato de que o aminoácido triptofano ser termo-lábil. Em nosso laboratório, as soluções de aminoácidos eram adicionados antes da autoclavagem. Entretanto, essa diferença na preparação dos meios ainda não explicava porque havia crescimento das leveduras no nosso meio líquido, mas não nas placas. Assim, outra diferença que se pode observar foi que o meio para placas feito por nós, era produzido em grande quantidade com todos os componentes adicionados antes de autoclavar, e depois fervido várias vezes em microondas para a confecção das placas quando necessárias. Provavelmente, a quantidade de triptofano permanecia suficiente para promover o crescimento das leveduras após autoclavação (meio líquido), mas era perdido depois de repetidos reaquecimentos (para a confecção das placas), ficando em quantidades insuficientes para o crescimento das células nas placas.

Para validar o método no laboratório uma nova transformação foi realizada utilizando recursos e estrutura próprios, corrigindo os erros identificados. Tal transformação obteve sucesso e o método foi então estabelecido no Laboratório de Neurobiologia.

4.8 Auto-ativação

A partir das colônias transformadas com os plasmídeos, selecionadas em meio seletivo, foi feita uma “master plate” e o ensaio de auto-ativação. Na **figura 15**, é possível observar, a representação de colônias positivas para degradação de X-Gal (pSH17-4) e, a não auto-ativação de algumas iscas. A isca correspondente ao domínio citoplasmático de Sema5A apresentou indícios de auto-ativação após 2 dias de crescimento, este teste foi novamente realizado e o resultado confirmado. Portanto a porção citoplasmática da Sema5A é capaz de auto-ativar o gene repórter.

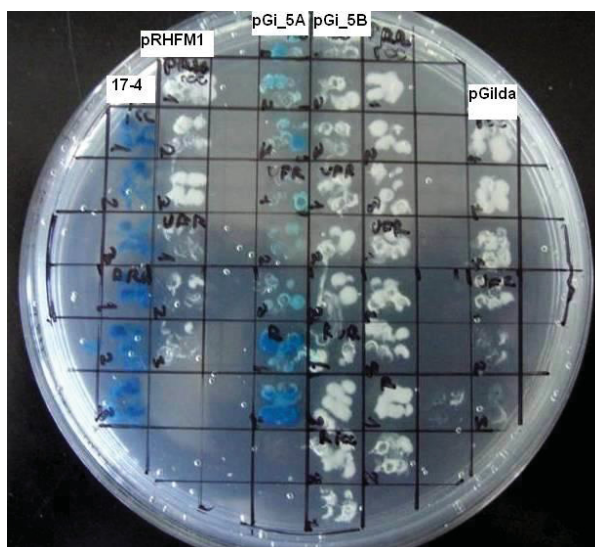


FIGURA 15. TESTE DE AUTO-ACTIVAÇÃO: Esta é uma placa X-Gal Gal/Raff –His – Ura, onde foram estricadas as transformações realizadas no ICC. Após ~72 horas observa-se o controle positivo **pSH17-4** representando o fenótipo azul. Continuando a sequencia das colunas da esquerda para direita: **pRHFM1**; **Sema_5A**; **Sema_5B**; **PrPc** (proteína prion celular, isca produzida para outro projeto); **pGILDA**. Também é observada a auto-ativação pela **Sema_5A**.

4.9 Expressão

Foram realizados 3 ensaios de expressão com as leveduras transformadas com: pGILDA. pGi_5A e pGi_5B, tanto os induzidos como não induzidos.

A banda esperada para o plasmídeo vazio é de ~29kDa, e para as construções sema5A e 5B é de ~36kDa. A banda para Sema5B foi identificada (**Fig. 16**), porem, em nenhum teste a banda para Sema5A foi observada (dados não mostrados). Em associação com o resultado do ensaio de auto-ativação, a construção pGi_5A não foi mais utilizada. Assim, seguiu-se a varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório com a isca do domínio citoplasmático de Sema5B.

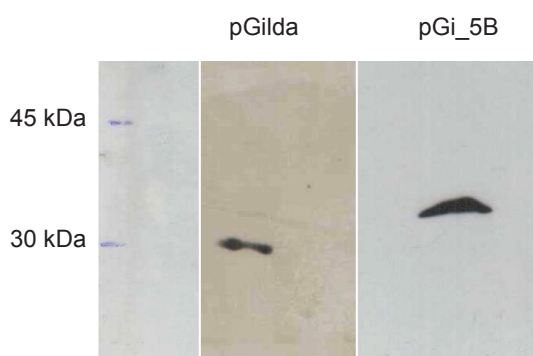


Figura 16: Ensaio de Expressão. Western-Blot com anti-corpo α -LexA. **pGilda:** Induzido e não induzido; **pGi_5B:** não-induzido e induzido.

Novas abordagens serão realizadas para determinar um padrão de expressão ainda não identificado neste teste, porém presente devido ao potencial de auto-ativação.

4.10 Viabilidade da Biblioteca para Mating

A biblioteca de cDNA de epitélio olfatório produzida pela Prof^a Dr^a. Adriana Mercadante possui abrangência de 10^6 mensagens de cDNA. Durante a produção desta biblioteca, foram selecionadas mensagens possuindo 300bp ou mais. Esta biblioteca está transformada em leveduras da linhagem EGY48. Para atestar se a alíquota congelada ainda mantinha a viabilidade necessária, foi preciso calcular sua atual representatividade. Foram contadas 33 colônias na placa com diluição 10^{-7} , e 299 colônias na placa 10^{-6} . Isto representa 33×10^7 unidades formadoras de colônia (cfu) em 100µl ou $3,3 \times 10^6$ cfu por µl. Utiliza-se para o “mating”, no mínimo 10x mais cfu em relação ao número de mensagens, devido à capacidade limitada de haver cruzamentos entre as leveduras (só 10% das leveduras fazem o cruzamento). Foi utilizado 20µl da biblioteca totalizando $6,6 \times 10^7$ mensagens.

O mesmo cálculo foi feito para as leveduras controles (EGY48 + pJG4-5 vazio) e chegou-se ao resultado de $\sim 1,6 \times 10^6$ cfu/µl. Para poder calcular posteriormente a transativação foi cruzado a mesma quantidade de cfu nas duas leveduras (controle e biblioteca) foi utilizado 40µl do controle para o cruzamento.

Em resumo para o “mating” controle, foi utilizado 4×10^6 cfu de RFY206 + pGi_5B (200µl de isca) e $6,6 \times 10^7$ cfu de EGY48 + pJG4-5 (40µl de controle) para cruzamento controle. Para o “mating” relevante, foi utilizado também 4×10^6 cfu de RFY206 + pGi_5B (200µl de isca) e $6,6 \times 10^7$ cfu de EGY48 + pJG4-5 transformado com cDNA de epitélio olfatório (biblioteca).

4.11 Potencial de Transativação

Espera-se que o gene repórter seja ativado somente quando ocorra a interação entre isca e presa, portanto, apenas colônias que apresentam as proteínas

isca e presa que interajam poderiam crescer em um meio sem leucina. Entretanto, pode também ocorrer expressão do gene repórter, sem que ocorra interação da isca com alguma presa, devido a transativação da própria isca. Esta habilidade de transativação da isca pode ser estimada calculando-se o potencial de transativação da proteína isca, o qual é expresso como a razão de colônias Leu+, que cresceram no meio sem leucina, pelo número de unidades formadoras de colônias encontrada no cruzamento da linhagem isca com a linhagem controle, que crescem no meio com Leucina. (GOLEMIS et al., 1999).

Este cálculo do potencial de transativação é importante para se estabelecer o número de colônias (isca+biblioteca) necessárias para garantir que todos da biblioteca pré-transformada tenham sido incluídos na varredura realizada nas placas mestres. Desta forma, é possível estimar quantos resultados positivos da varredura são falsos, ou seja, gerados pela transativação da própria isca. Isto ajuda a evitar problemas como, por exemplo, quando são escolhidas poucas colônias para a realização da varredura e são utilizadas iscas que possuem um alto potencial de ativação, o que resultaria em uma varredura onde a maior parte dos resultados positivos é falsa e não corrobora a interação entre isca e presa.

O cálculo do potencial de transativação da isca Sema5B, utilizada na varredura deste trabalho, foi realizado da seguinte forma: primeiro, foi estimado o número de colônias totais provenientes do cruzamento isca+controle através da absorbância da amostra a 600 nm (OD_{600} obtida igual a 8; 1 OD_{600} corresponde a cerca de 2×10^7 células por ml, logo, a amostra em questão corresponde a $8 \times 2 \times 10^7$, que é igual a $1,6 \times 10^7$ células/100 μ l); depois, foi estimado o potencial de transativação através da razão entre as colônias da amostra não diluída que de fato cresceram em um meio sem leucina, (colônias Leu+), e o número de cfu totais como expressas na **Quadro 2** ($31 \text{ colônias Leu+} / 1,6 \times 10^7 = \sim 2 \times 10^{-6} \text{ colônias Leu+/cfu}$);

Multiplicando-se o valor de transativação, pelo número de transformantes da biblioteca que foram utilizados para o “mating” ($6,6 \times 10^7$), obteve-se o número mínimo de colônias que seriam necessárias para avaliação: 132.

Controle		
	Meio SD Gal/Raff -Ura, -His,-Trp,- Leu	Meio SD Gal/Raff -Ura, -His,-Trp,+ Leu
10^{-6}	0	10
10^{-5}	0	119
10^{-4}	0	>
10^{-3}	0	>
10^{-2}	0	>
10^{-1}	3	>
Não diluído	31	>

Quadro 2: Potencial de transativação para pGi_5B. Por estimativa feita pela DO_{600} da cultura líquida cresceram $1,6 \times 10^7$ cfu/100 μ l no meio +Leu. No meio –Leu cresceram $3,1 \times 10$ cfu/ μ l. Desta razão obtém-se o potencial de transativação, aqui calculado como: 2×10^{-6} Leu⁺/cfu.

Uma vez reconhecido o potencial de transativação, foi possível estabelecer quantas colônias deveriam ser coletadas de cada uma das vinte placas do não diluído do cruzamento isca+biblioteca. De acordo com o protocolo descrito por Golemis *et al.* (1999), uma isca sem potencial de transativação produz menos de 10^{-6} Leu⁺/cfu, e para que a isca possa ser utilizada em uma busca de interação ela não pode ultrapassar um valor maior que 10^{-4} Leu⁺/cfu. Se uma isca sem potencial de transativação, onde quase todos os resultados positivos das colônias que compõe a varredura estarão reportando a interação isca-presca de fato, produz menos de cerca de 10^{-6} Leu⁺/cfu (GOLEMIS *et al.*, 1999), então, na varredura Sema_5B onde o potencial de transativação é igual a 2×10^{-6} Leu⁺/cfu e com uma biblioteca com $6,6 \times 10^7$, nós teremos duas vezes mais falsos positivos do que o ideal indicado no protocolo, sendo assim, deve-se escolher duas vezes mais colônias de cada uma das vinte placas e de acordo com o calculo, em torno de 135 colônias. Optou-se por escolher em torno de cinco colônias de cada uma das placas para compor as “*master plates*” a fim de garantir um razoável resultado na varredura, resultando assim em um total de 99 colônias distribuídas em duas “*master plates*”, uma com 46 colônias grandes (>1,5mm = Gr) e outra com 53 colônias pequenas (<1mm = Pq). As colônias de ambas as placas foram numeradas e diferenciadas pela sigla Pq e Gr. Essa distinção entre o tamanho das colônias poderia indicar diferentes forças de interações: provavelmente as colônias maiores foram capazes de crescer antes em meio –Leu e assim, a interação entre a isca e a presa deve ter sido mais forte (e/ou mais estável) para ativar o gene repórter LEU2. O raciocínio inverso pode ser

empregado para as colônias menores, que demoraram mais para crescer em meio seletivo -Leu.

Ao final de todos os testes, foi observado que ~10% das colônias selecionadas neste passo resultaram em potenciais candidatos a serem sequenciados. Posteriormente, foram isoladas mais 60 colônias a partir das placas “mating”, desta vez, partir dos resultados das primeiras 99 colônias, apenas colônias grandes foram escolhidas.

4.12 Seleção de Colônias

As “master plates” de SD Glicose -Ura,-His,-Trp foram incubadas durante dois dias. Após crescimento, as colônias foram testadas em diferentes meios para checar a ativação do gene repórter (Lac-Z) e a dependência da interação por galactose (indução da isca e da presa). A ativação do gene repórter (Lac-Z) é monitorada através da atividade da enzima β -galactosidade. Esta enzima converte a X-Gal (80 μ g/ml) fornecida às colônias em um produto colorimétrico que produz uma coloração azul.

A **figura 17** mostra o ensaio de ativação dos genes repórteres em placas SD Gal +Leu e SD Gli +Leu, ambas contendo X-Gal, que foram carimbadas a partir das “master plates”.

Além do teste para ativação do gene Lac-Z, foi testado a ativação do gene LEU2 da levedura EGY48, este gene esta sob influencia do promotor Lex-A, e se ativa da mesma forma que o gene Lac-Z. (**Fig. 6**). Placas com o meio SD Gal –Leu e SD Gli –Leu foram carimbadas a partir da “master plate” e o crescimento de colônias foi acompanhado (**Fig. 17**).

As colônias que atenderam aos critérios dos testes **Quadro 1** foram selecionadas a exemplo da colônia G12, destacada na **Figura 17**.

A intensidade da cor azul observada na placa SD Gal/Raf (X-Gal) –ura, -his, -trp variou muito nas diferentes colônias, bem como ao longo dos dias (dado não mostrado), indicando assim que provavelmente haviam diferentes intensidades de interação.

Um total de 159 colônias foram selecionadas ao acaso das 20 placas do cruzamento, porém apenas 27 colônias atenderam a todos os requisitos destes testes (como a colônia G12 na **figura17**).

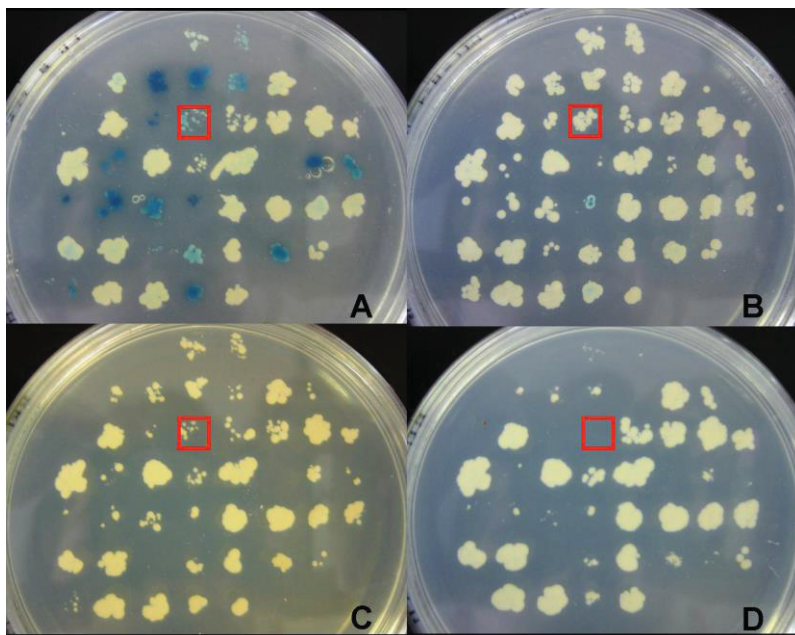


FIGURA 17. TESTES PARA SELEÇÃO DE COLÔNIAS: Colônias Grandes (Gr) testadas após o mating, cultivadas após 48 horas. Placas: **A:** SD Gal X-Gal; **B:** SD Gli X-Gal; **C:** SD Gal –Leu; **D:** SD Gli –Leu. O **quadrado vermelho** indica a colônia G12 que atendeu aos requisitos para a escolha: apresentar coloração azulada na placa **A**; não desenvolver coloração na placa **B**; crescer na placa **C**; e não crescer na placa **D**. Outras colônias com o mesmo padrão também foram escolhidas.

4.13 PCR de Levedura

Foi realizada uma PCR utilizando as colônias de levedura, para amplificar o inserto contido no vetor pJG4-5. A **Figura 18** mostra o resultado de uma PCR piloto, o plasmídeo vazio pJG4-5 foi utilizado como controle positivo para reação, uma banda bem marcada com 120 pares de base representa a extensão do fragmento do plasmídeo quando vazio, esta mesma banda se faz presente em todas as amostras.

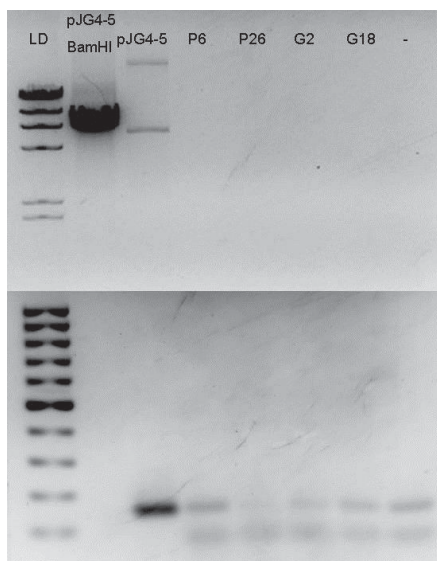


Figura 18. PCR DE CÔLONIA PILOTO EM LEVEDURAS. LD: Marcadores de pares de base Lambda/HindIII e 100bp Gene Ruller; **pJG4-5 BamHI**: Plasmídeo pJG4-5 linearizado; **pJG4-5**: Controle positivo da reação; **P6, P26, G2 e G18**: Colônias de leveduras testadas; **-**: Controle negativo. Em todas as amostras, a banda referente ao plasmídeo vazio é presente, uma segunda banda mais abaixo representa provavelmente, dímeros de oligonucleotídeos.

4.14 Lise de Leveduras e Purificação de Plasmídeos

Como não foi obtido sucesso na PCR de colônia em leveduras, se fez necessário a realização de uma extração de DNA dessas células para identificar dos insertos de pJG4-5 nos clones positivos para interação. Como base foi utilizado o protocolo de lise presente no manual do Duplo-Híbrido da OriGene, porém algumas modificações se faziam necessárias para atender às condições e possibilidades do laboratório.

Foi realizada uma lise piloto para verificar qual tamanho de *beads* de vidro, melhor serviria para a lise e purificação de DNA plasmidial de colônias de levedura. Foram selecionadas 2 colônias aleatórias a serem submetidas ao protocolo de lise. Foi utilizado *beads* de 150-212µm e *beads* de ~2mm para cada levedura. Uma das amostras foi perdida no processo. Os plasmídeos lisados foram quantificados e submetidos à reação de PCR (**Fig. 19**).

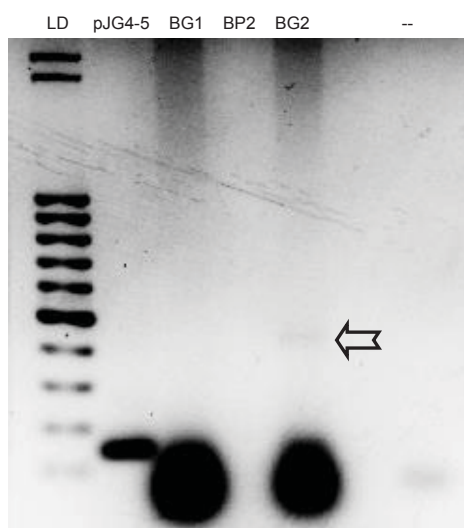


Figura 19. PCR PÓS LISE. LD: Marcador de pares de base GeneRuller 100bp; **pJG4-5:** Controle positivo; **BG1:** colônia lisada com *beads* de ~2mm; **BP2:** Colônia lisada com *beads* de 150-215µm; **BG2:** Mesma colônia que BP, mas lisada com *beads* de ~2mm. -: Controle negativo; **Seta:** Banda com aproximadamente 450bp, indicando a presença de um inserto no vetor pJG4-5.

A partir desse resultado, todas as lises subsequentes foram realizadas utilizando-se os *beads* com ~2mm de diâmetro lavados em ácido. Para diminuir a degradação de DNA, a etapa de agitação foi modificada do protocolo de ORIGENE, 2008, reduzindo-se a intensidade, utilizando um shaker de tubos, e ampliando o tempo de 2 para 5 minutos, resultando no aumento de eficiência de amplificação a partir desses moldes (**Fig. 20**).

Todas as 27 colônias candidatas nos testes de atividade da Lac-Z e da ativação do gene LEU2 (ver exemplo na. **Fig 17**) foram lisadas e submetidas á reação de PCR. As colônias que apresentaram bandas na reação de PCR foram selecionadas para eletroporação em bactéria.

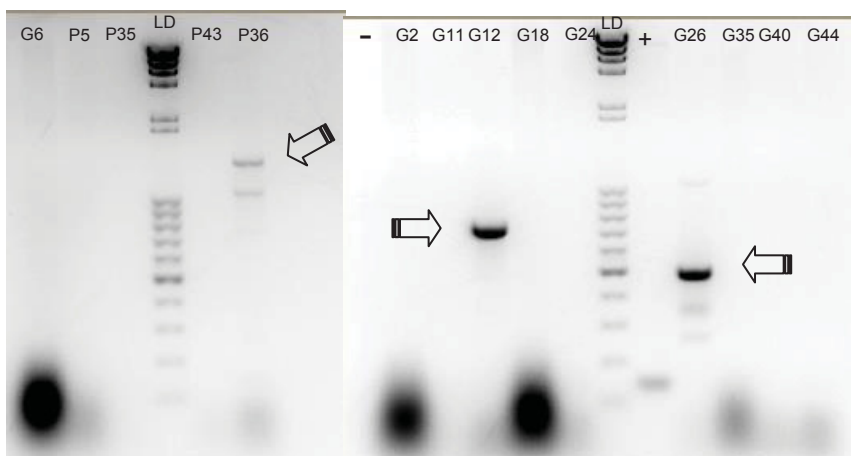


Figura 20. PCR APÓS NOVA LISE. LD: Marcadores de pares de base λ -Hind/ 100bp; -: Controle negativo; +: Controle positivo; **G6, P5, P35, P43, P36, G2, G11, G12, G18, G24, G26, G35, G40, G44:** Colônias de levedura; **Flechas:** Bandas das colônias P36, G12 e G26 amplificadas do plasmídeo pJG4-5 com numero de bases maior que o positivo, logo, tais plasmídeos purificados dessas colônias foram escolhidos para serem transformados em bactérias.

4.15 Eletroporação e PCR de Colônia em Bactérias

Os plasmídeos purificados das 19 colônias de leveduras positivas foram eletroporados em bactérias DH5 α .

O protocolo de lise e purificação seleciona, através do seu pH e força osmótica, DNAs plasmidiais e permite com que o produto da purificação fique livre de contaminações não só protéicas mas também de DNA genômico (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Como no momento da lise das leveduras haviam 3 plasmídeos diferentes por célula (pGILDA, pSH18-34 e pJG4-5), o produto purificado dessas leveduras também contém esses plasmídeos. E como todos conferem resistência à ampicilina, se faz necessário selecionar um número adequado de colônias a serem testadas quando esse produto é transformado em bactérias, para que seja possível encontrar clones portadores do plasmídeo pJG4-5. De cada transformação com os plasmídeos purificados de cada colônia positiva de levedura, foram escolhidas de 6 a 8 colônias, e estas submetidas à PCR com os iniciadores do plasmídeo pJG4-5 (e.g. **Fig. 21**).

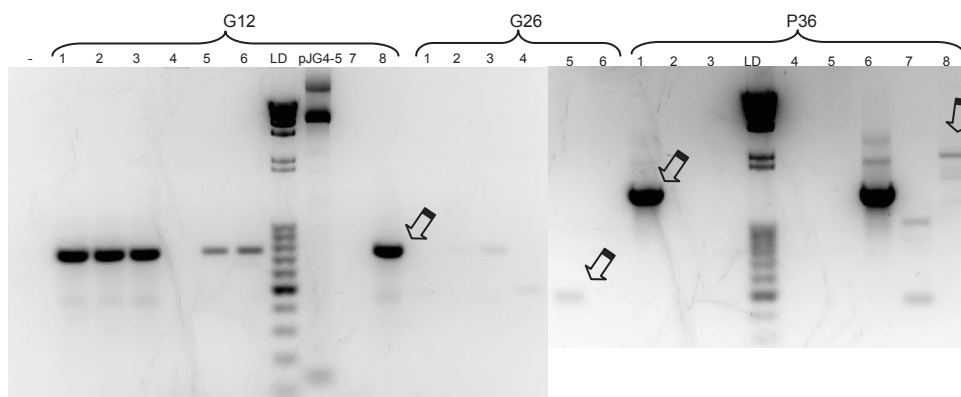


Figura 21. PCR DE COLÔNIA DE DH5α. LD: Marcadores de pares de base λ -Hind/ 100bp; -: Controle negativo; **pJG4-5**: Controle positivo; **G12, G26 e P36, 1-8**: Purificados das leveduras G12, G26 e P36, transformados nas colônias de 1 a 8 de DH5α; **Flechas**: Mostram as bandas correspondentes à amplificação do pJG4-5 nas colônias foram selecionadas para mini-prep.

Com base na PCR, foram escolhidos os clones que apresentaram banda na altura esperada e com bandas de maior intensidade dentre a mesma transformação. A partir das colônias de bactérias selecionadas, foram realizadas mini-preps e, para alguns plasmídeos purificados, realizou-se digestões para verificar a liberação dos insertos, como mostra a **figura 22**, com as enzimas EcoRI e XhoI, as mesmas usadas na inserção do cDNA no plasmídeo.

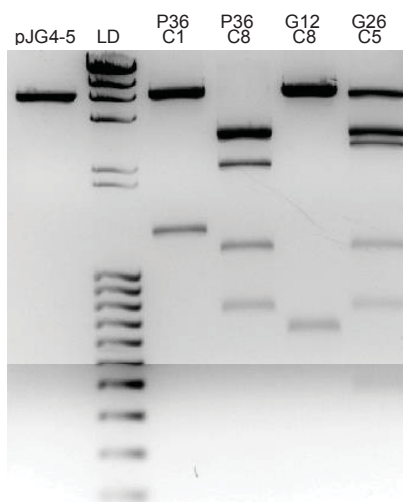


Figura 22. DUPLA DIGESTÃO. **pJG4-5**: Plasmídeo linearizado com EcoRI; **LD**: Marcadores de pares de base λ -Hind/ 100bp; **P36 c1, P36 c8, G12 c8 e G26 c5**: Mini-preps digeridas com EcoRI e XhoI, para identificar a liberação do inserto do plasmídeo pJG4-5.

Algumas colônias, como a P36 c8, não apresentaram um perfil eletroforético adequado na PCR de colônia (última canaleta da **figura 21**) e o padrão da digestão também indicou não se tratar do pJG4-5 (**Fig. 22**). Assim, as colônias que

apresentaram bandas fracas e/ou múltiplas nas reações de PCR foram descartadas.

Estas etapas também foram realizadas, a nível de teste e preparação, com a levedura inicialmente lisada BG2 (Item 4.14 **Fig. 19**).

4.16 Sequenciamento de Nucleotídeos

Parte das 11 interações candidatas identificadas na seleção de colônias por expressão de β -galactosidase e sobrevivência em meio Gal – Leu, que posteriormente tiveram o inserto presente no plasmídeo pJG4-5, identificado por PCR; foram submetidas à sequenciamento para determinação da identidade da proteína que se associa com a porção citoplasmática da semaforina 5B (Sema_5B) (**Quadro 3**).

Nº de clones varridos	6×10^7
Nº de clones Leu ⁺	$\sim 10^4$
Nº de clones selecionados para testes	159
Clones + para X-Gal e Leu	27
Clones + no PCR	19
Clones + em Bactérias	11
Clones Sequenciados	9

Quadro 3. RELAÇÃO DE QUANTIDADE E CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS. Este quadro representa em números cada etapa do duplo-híbrido relacionada a pontos de seleção. Observa-se que dentro da amostra inicialmente separada de 159 colônias, apenas 5,6% delas se encontravam aptas a passarem pelos pontos de checagem para finalmente serem sequenciadas.

Os ligantes identificados (resultado do sequenciamento) estão apresentados no **quadro 4**.

Identidade	Função	Região da proteína codificada pelo inserto
Mus musculus cysteine-rich PDZ-binding protein (Cript), mRNA NCBI Reference Sequence: NM_019936.3	Ponte de ligação entre proteínas ao citoesqueleto.	Proteína sendo expressa em fase do 7º aa até o códon de terminação da mesma
Mus musculus phospholipid scramblase 2 (Plscr2), transcript variant B, mRNA NCBI Reference Sequence: NM_008880.3	Transporte de fosfolipídeos entre hemicamadas lipídicas. Proteína cálcio dependente, pode estar associada a destino celular e/ou mudanças de membrana para movimentação celular.	Proteína sendo expressa em fase do 55º aa até o códon de terminação da mesma.
Mus musculus calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit (Cacnb3), transcript variant 2, mRNA NCBI Reference Sequence: NM_001044741.1	Canal de Cálcio Voltagem-dependente.	A região encontrada refere-se a 713 nucleotídeos da região 3'UTR (região não-traduzida).
Mus musculus trafficking protein particle complex 6A (Trappc6a), mRNA NCBI Reference Sequence: NM_025960.3	Tráfego de vesículas intracelular.	Proteína sendo expressa em fase do 8º aa até o códon de terminação da mesma.
Mus musculus zinc finger, MYM-type 5 (Zmym5), mRNA NCBI Reference Sequence: NM_144842.3	Proteína ligada ao destino celular.	Sequenciamento de pouca qualidade.
Mus musculus mucin 2 (Muc2), mRNA NCBI Reference Sequence: NM_023566.2	Glicoproteína secretada por tecidos epiteliais; componente do muco; Defesa contra infecções e parasitas do trato gastrointestinal. Supressão de câncer gastrintestinal	Sequenciamento de pouca qualidade.

Quadro 4. RESULTADO DOS SEQUENCIAMENTOS DE CANDIDATOS À LIGANTES DE SEMA_5B IDENTIFICADOS POR DUPLO-HÍBRIDO.

A partir do mapa do plasmídeo pJG4-5 e do cromatograma gerado pelo sequenciador, a região onde o cDNA está clonado foi identificada e analisada por ferramentas eletrônicas para chegar a uma identidade, após essa verificação, foi observado se estas sequências encontravam-se em frame com o plasmídeo.

Assim, até o momento, as candidatas mais prováveis a serem ligantes do domínio citoplasmático de Sema5B foram: Cript; Plscr2 (Scramblase2) e Trappc6a. As outras sequências obtidas, mucina 2 e “zinc-finger MYM-type 5”, ainda precisam ser confirmadas para análises mais detalhadas. Já a sequência do canal de cálcio foi identificada em 3 clones diferentes, porém trata-se de uma região não traduzida da proteína e, portanto, é preciso analisar o peptídeo expresso mais a fundo.

Outras interações estão sendo sequenciadas e analisadas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Quanto à Padronização do Sistema de Duplo-híbrido em Leveduras

Com a finalidade de melhorar o entendimento deste trabalho, optou-se por discutir a padronização das várias etapas da metodologia do duplo-híbrido na parte de “Resultados” (item 4). Como foi visto, a padronização do sistema de duplo - híbrido em leveduras passou por alguns contratemplos, porém agora se encontra completamente disponível para outros pesquisadores interessados em estudar interações entre proteínas. Em paralelo com este trabalho, outra proteína foi usada como isca, em outro projeto. A proteína príon celular, (PrP^C) também foi usada na varredura da biblioteca de epitélio olfatório e já foram obtidos alguns ligantes (dados não apresentados nesse trabalho). Esta metodologia, portanto, foi validada com dois trabalhos distintos demonstrando sua padronização e implementação bem sucedidas no laboratório.

5.2 Quanto à Caracterização das Iscas para Sema 5A e Sema5B

Para que uma isca possa ser utilizada em uma varredura no sistema duplo-híbrido ela deve apresentar as seguintes características: a)-não ser capaz por si só de ativar a transcrição dos genes repórteres, b)-deve ser capaz de entrar no núcleo da levedura e de se ligar ao sítio promotor para Lex A, c)-deve ser expressa de maneira estável em levedura. Como pôde ser visto, a isca referente ao domínio citoplasmático de Sema5B não foi capaz de auto-ativar o gene repórter Lac-Z (**Fig. 15**) e foi expressa corretamente nas leveduras (**Fig. 16**). Assim, ela pode ser utilizada na varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório.

A porção citoplasmática da Semaforina5A não pôde ser usada devido ao seu potencial de auto-ativação (**Fig. 15**). Existem alternativas para que esta isca possa vir a ser utilizada no duplo-híbrido, uma dessas alternativas é alterar o plasmídeo repórter e a levedura EGY para outras com promotores menos sensíveis como o pJK103 (sensibilidade média) ou pRB1840 (baixa sensibilidade) e a EGY194

(sensibilidade média) ou EGY188 (baixa sensibilidade) (ORIGENE, 2008). Outra alternativa envolve um estudo do domínio Sema_5A, identificando potenciais domínios de ativação que poderiam ser removidos na construção de uma nova isca.

Foi curioso o fato da isca de Sema5A não ter sido identificada no ensaio de expressão (Westen Blotting, **figura 15**). Como ela é capaz de ativar o gene repórter e não ser expressa? Essa questão ainda será mais bem investigada. Mas é possível que durante a indução da isca para a preparação dos extratos protéicos, a proteína de interesse tenha sido degradada.

5.3 Quanto aos Ligantes Obtidos na Varredura com a Isca de Sema5B

A varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório utilizando a Sema_5B como isca resultou na identificação, até o momento, de 6 sequências distintas. Como já comentado, duas sequências ainda precisam ser confirmadas: mucina 2, e “zinc finger, MYM-type 5”. Assim, as proteínas obtidas, Cript; Plscr2 (Scramblase2) e Trappc6a são, até o momento, as candidatas mais prováveis a serem reais ligantes da porção citoplasmática de Sema5B. É importante destacar que ainda será necessário realizar outros ensaios para comprovar e investigar melhor as interações encontradas, mas conhecendo a identidade e a função das candidatas já é possível analisar se suas interações com o domínio citoplasmático de Sema5B fazem sentido, bem como discutir um pouco sobre o possível papel fisiológico destas ligações. Outros testes serão realizados com o sistema de duplo-híbrido em leveduras o qual irá identificar um potencial auto-ativador dentre as proteínas encontradas.

Estas interações podem dar um indício de como a Sema_5B pode atuar no contexto de Epitélio Olfatório. Porém muitos testes deverão ainda ser realizados para determinar a relevância biológica dessas interações.

A proteína Cript (Cysteine-Rich Interactor of PDZ 3 – ligante de PDZ 3 rico em cisteína) descrita por Niethammer *et al.* (1998), foi inicialmente isolada por sistema de duplo-híbrido em leveduras por interagir com a proteína sináptica PSD-95/SAP90 (NIETHAMMER *et al.*, 1998). A interação com PSD95 se faz via domínio PDZ. Neste

mesmo trabalho, utilizando cultura de neurônios hipocampais, foi visualizado que a Cript está presente nas sinapses em dendritos, porém não presentes em sinapses inibitórias. Este trabalho também abordou que a Cript tem papel fundamental na formação de microtúbulos em regiões pré sinápticas. Em O'Connor *et al.* (2009), é mostrado que a Sema5B tem um papel, quando presente, na redução no número de sinapses e diminuição do tamanho de compartimentos pré e pós sinápticos. Possivelmente o mecanismo em que esse processo ocorre se deve à interação da Sema_5B com a Cript (O'CONNOR *et al.*, 2009).

Fukunaga *et al.* (2005) indica que a Cript, em associação com a PSD-95, aumenta a afinidade da PSD-95 por calmodulina, aumentando sua função. Kenneth, 2007 mostrou que a Sema5B é capaz de inibir o cone de crescimento por aumentar o influxo de Ca^{++} mediado por calpaína e calcineurina, ora a calcineurina não é só ativada por cálcio, mas também pela calmodulina. Kenneth apenas mostrou que a Sema5B promove influxo de cálcio via calcineurina e calpaína, o mecanismo que leva a ativação dessas proteínas pela Sema5B não era conhecido. Portanto, mais uma vez a Cript pode responder esta questão. Outros estudos e experimentos deverão ser realizados para validar a interação da Sema_5B com a Cript e também para avaliar os mecanismos de ação conjunta nos diferentes processos biológicos propostos (FUKUNAGA *et al.*, 2005).

É interessante também citar que outros trabalhos demonstraram que a PSD-95 interage diretamente com a Sema4C (INAGAKI *et al.*, 2001) e Sema4F (SCHULTZE *et al.*, 2001). Essas semaforinas também são transmembrânicas, assim como a Sema5B. Dessa forma, a localização de semaforinas em sinapse sugerem que elas possam ter um papel importante nesses domínios.

A família pertencente da Plscr2 (Phospholipid Scramblase 2 – Scramblase de fosfolipídeos 2) são scramblases dependente de Ca^{++} , responsáveis por perda de assimetria entre as bicamadas lipídicas da membrana plasmática (SAHU *et al.*, 2007). A função de muitas scramblases, inclusive a 2, ainda não é bem conhecida inclusive, sua função de transportar fosfolipídeos ainda é duvidosa (BEVER; WILLIAMSON, 2010), mesmo que exista grande homologia entre a Plscr1 (SAHU *et al.*, 2007) já bem estudada e conhecida. Mesmo a função de transporte de lipídeos da bem estudada Plscr1 ainda permanece em dúvida. Estudos relacionam às scramblases em situações como: manutenção da estrutura e função da mitocôndria,

eventos apoptóticos, metabolismo lipídico e trombose, vias de sinalização por exposição de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina na bicamada externa da membrana plasmática ou por ação direta quando secretada (MERREGAERT et al., 2010). Como a Plscr2 é pouco conhecida, não é possível extrapolar uma provável interação biológica com a Sema_5B, fora o fato de que ambas estão presentes na membrana plasmática e participam de eventos Ca^{++} dependentes.

As scramblases possuem diferentes domínios bem conservados entre elas, incluindo um domínio de localização nuclear e um domínio de ligação ao DNA, é provável que estes domínios estejam de alguma maneira provocando a ativação dos genes repórteres do sistema duplo-híbrido. Em um primeiro momento, essa possibilidade será explorada em um experimento em que a levedura EGY48 que possui a construção contendo a Plscr2 será cultivada em placas SD GAL –Leu e X-Gal onde também estará presente leveduras RFY206 transformadas com pGILDA, pGi_5B e outros. O co-cultivo em um padrão de cruz irá fazer com que ocorra cruzamentos das linhagens onde elas se intercedem. O resultado mostrará em qual interseção ocorrerá a ativação dos genes repórteres elucidando a questão de auto-ativação.

A proteína Trappc6a (Trafficking protein particle complex 6A) é uma proteína integrante da família Trapp responsáveis pelo transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o Golgi e também coordenam o tráfego de vesículas entre as cisternas do Golgi (SACHER et al., 2008). Em mamíferos a Trappc6a está implicada em eventos pós Golgi também (GWYNN et al., 2006). A Trappc6A é homóloga à proteína da mesma família porém presente em leveduras Trs33p (SACHER et al., 2008). Esta interação também será mais bem entendida com o mesmo o teste de cruzamento com colônias RFY controle.

Apesar do sistema de duplo-híbrido ser capaz de identificar parceiros moleculares diretos de proteínas investigadas, ele por si só não é capaz de estabelecer com certeza interações biologicamente relevantes. Mais que uma técnica que responde questões, o duplo-híbrido na verdade cria novas e interessantes perguntas a respeito de interações protéicas. Com certeza é uma

ótima técnica inicial para qualquer estudo de atividade biológica para uma proteína cuja ação é desconhecida.

6. CONCLUSÃO

- As construções das porções citoplasmáticas das Semaforina5A e 5B no plasmídeo isca pGILDA (pGi_5A e pGi_5B) foram obtidas e sequenciadas, demonstrado a correta inserção das sequências de interesse no plasmídeo;
- De acordo com os ensaios de auto-ativação e expressão, a construção pGi_5B não auto-ativou, foi expressa na levedura e pôde ser usado como isca no Sistema de Duplo-Híbrido em Leveduras;
- De acordo com os mesmos testes, a construção pGi_5A apresentou auto-ativação e não foi expressa, logo não pôde ser utilizado no sistema;
- Todos os problemas não abordados pela literatura foram resolvidos, estabelecendo um *modus operandi* para o uso da técnica;
- Uma varredura com a isca pGi_5B foi realizada utilizando uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório, resultando na identificação de alguns ligantes. Suas reais participações biológicas envolvendo a Sema_5B ainda serão mais bem investigadas;
- Diversos parceiros foram encontrados, alguns, como Cript; Plscr2 (Scramblase2) e Trappc6a com grande relevância biológica determinada pela leitura e interpretação de dados publicados, porém não auto-suficientes para determinar uma relação definitivamente relevante.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. C.; TUCKER, R. P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 218, n. 2, p. 280–99, 2000.
- ADAMS, R. H.; BETZ, H.; PÜSCHEL, A W. A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. **Mechanisms of development**, v. 57, n. 1, p. 33–45, 1996.
- ADAMS, R. H.; LOHRUM, M.; KLOSTERMANN, A.; BETZ, H.; PÜSCHEL, A W. The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. **The EMBO journal**, v. 16, n. 20, p. 6077–86, 1997.
- ARTIGIANI, S.; CONROTTO, P.; FAZZARI, P.; et al. Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. **EMBO Reports**, v. 5, n. 7, p. 710–714, 2004.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology** (John Wiley & Sons, Inc.), vol.3, un. 20.1, 1999.
- BEVERS, E. M.; WILLIAMSON, P. L. Phospholipid scramblase: an update. **FEBS letters**, v. 584, n. 13, p. 2724–30, 2010. Federation of European Biochemical Societies.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic acids research**, v. 7, n. 6, p. 1513–23, 1979.
- BRENT, R.; PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. **Cell**, v. 43, n. 3 Pt 2, p. 729–736, 1985. Elsevier Ltd.
- CASTELLANI, V.; ROUGON, G. Control of semaphorin signaling. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 5, p. 532–41, 2002.
- CLONTECH. **Yeast Protocols Handbook**. Clontech Laboratories, Inc., 2000.
- DANNECKER, L. E. C. VON; MERCADANTE, A. F.; MALNIC, B. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 15, p. 3793–800, 2005. Soc Neuroscience.
- ExPASy Proteomics Server**. Disponível em <http://www.expasy.ch/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.
- IORE, R.; RAHIM, B.; CHRISTOFFELS, V. M.; MOORMAN, A. F. M.; PÜSCHEL, A. W. Inactivation of the Sema5a Gene Results in Embryonic Lethality and Defective

Remodeling of the Cranial Vascular System. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 6, p. 2310–2319, 2005. American Society for Microbiology.

FUKUNAGA, Y.; MATSUBARA, M.; NAGAI, R.; MIYAZAWA, A. The interaction between PSD-95 and Ca²⁺/calmodulin is enhanced by PDZ-binding proteins. **Journal of biochemistry**, v. 138, n. 2, p. 177–82, 2005.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 313, n. 4, p. 107–20, 2006.

GIGER, R. J.; KOLODKIN, A. L. Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 1–4, 2001.

GOLEMIS, E. A.; SEREBRIISKII, I.; LAW, S. F. The yeast two-hybrid system: criteria for detecting physiologically significant protein-protein interactions. **Current issues in molecular biology**, v. 1, n. 1-2, p. 31–45, 1999.

GOODMAN, C. .; KOLODKIN, A. .; LUO, Y.; PÜSCHEL, A. .; RAPER, J. . Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. **Cell**, v. 97, n. 5, p. 551–552, 1999.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GWYNN, B.; SMITH, R. S.; ROWE, L. B.; TAYLOR, B. A.; PETERS, L. L. A mouse TRAPP-related protein is involved in pigmentation. **Genomics**, v. 88, n. 2, p. 196–203, 2006.

HALLORAN, M. C.; WOLMAN, M. A. Repulsion or adhesion: receptors make the call. **Current opinion in cell biology**, v. 18, n. 5, p. 533–40, 2006.

HILARIO, J. D.; RODINO-KLAPAC, L. R.; WANG, C.; BEATTIE, C. E. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. **Developmental biology**, v. 326, n. 1, p. 190–200, 2009. Elsevier Inc.

HUBER, A. B.; KOLODKIN, A. L.; GINTY, D. D.; CLOUTIER, J.-F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. **Annual review of neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 509–63, 2003.

INAGAKI, S.; OHOKA, Y.; SUGIMOTO, H.; et al. Sema4c, a transmembrane semaphorin, interacts with a post-synaptic density protein, PSD-95. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 12, p. 9174–81, 2001.

Integrated DNA Technologies. Disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

KAMIGUCHI, H.; LEMMON, V. IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 598–605, 2000.

KANTOR, D. B.; CHIVATAKARN, O.; PEER, K. L.; et al. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. **Neuron**, v. 44, n. 6, p. 961–75, 2004.

KENNEDY, T. E. Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. **Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire**, v. 78, n. 5, p. 569–75, 2000.

KOLK, S. M.; GUNPUT, R.-A. F.; TRAN, T. S.; et al. Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 40, p. 12542–57, 2009.

KOLODKIN, A. L.; MATTHES, D. J.; O'CONNOR, T. P.; et al. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. **Neuron**, v. 9, n. 5, p. 831–45, 1992.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–34, 2010.

LETT, R. L. M.; WANG, W.; O'CONNOR, T. P. Semaphorin 5B is a novel inhibitory cue for corticofugal axons. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 19, n. 6, p. 1408–21, 2009.

MATTHES, D. J.; SINK, H.; KOLODKIN, A. L.; GOODMAN, C. S. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 631–9, 1995.

MERREGAERT, J.; LANGEN, J. VAN; HANSEN, U.; et al. Phospholipid scramblase 1 is secreted by a lipid raft-dependent pathway and interacts with the extracellular matrix protein 1 in the dermal epidermal junction zone of human skin. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37823–37, 2010.

MUELLER, B. K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. **Annual review of neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 351–88, 1999. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.

NCBI HomePage. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

NEBcutter V2.0. Disponível em <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

NIETHAMMER, M.; VALTSCHANOFF, J. G.; KAPOOR, T. M.; et al. CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 693–707, 1998.

O'CONNOR, T. P.; COCKBURN, K.; WANG, W.; et al. Semaphorin 5B mediates synapse elimination in hippocampal neurons. **Neural development**, v. 4, p. 18, 2009.

ORF Finder. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

ORIGENE. **DupLEX-A Yeast Two-Hybrid System.** OriGene Technologies, Inc., v. 2,7, 2008

OSTER, S. F.; BODEKER, M. O.; HE, F.; SRETAVAN, D. W. Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. **Development Cambridge England**, v. 130, n. 4, p. 775–784, 2003.

PASTERKAMP, R. J.; PESCHON, J. J.; SPRIGGS, M. K.; KOLODKIN, A. L. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 398–405, 2003. Nature Publishing Group.

PATEL, B. N.; VACTOR, D. L. VAN. Axon guidance: the cytoplasmic tail. **Current opinion in cell biology**, v. 14, n. 2, p. 221–9, 2002.

PÜSCHEL, A. W. Semaphorins: repulsive guidance molecules show their attractive side. **Nature Neuroscience**, 1999.

RANSCHT, B. Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 643–51, 2000.

RAPER, J. A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 1, p. 88–94, 2000.

ROHM, B.; OTTEMEYER, A.; LOHRUM, M.; PÜSCHEL, A. W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. **Mechanisms of development**, v. 93, n. 1-2, p. 95–104, 2000.

ROHM, B.; RAHIM, B.; KLEIBER, B.; HOVATTA, I.; PÜSCHEL, A. W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. **FEBS letters**, v. 486, n. 1, p. 68–72, 2000.

ROLLMANN, S. M.; YAMAMOTO, A.; GOOSSENS, T.; et al. The Early Developmental Gene Semaphorin 5c Contributes to Olfactory Behavior in Adult *Drosophila*. **Genetics**, v. 176, n. 2, p. 947–956, 2007. Copyright © 2007 by the Genetics Society of America.

SACHER, M.; KIM, Y.-G.; LAVIE, A.; OH, B.-H.; SEGEV, N. The TRAPP complex: insights into its architecture and function. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 9, n. 12, p. 2032–42, 2008.

SAHU, S. K.; GUMMADI, S. N.; MANOJ, N.; ARADHYAM, G. K. Phospholipid scramblases: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 462, n. 1, p. 103–14, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHULTZE, W.; EULENBURG, V.; LESSMANN, V.; et al. Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95. **Journal of neurochemistry**, v. 78, n. 3, p. 482–9, 2001.

SHIPP, E. L.; HSIEH-WILSON, L. C. Profiling the sulfation specificities of glycosaminoglycan interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays. **Chemistry & biology**, v. 14, n. 2, p. 195–208, 2007.

SIMON, J.R. Transformation of Intact Yeast Cell by Electroporation In: **Methods in Enzymology**. V. 217. Academic Press Inc., 1993.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P. M. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 9, p. 377–83, 2000.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P. M. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. **EMBO reports**, v. 5, n. 4, p. 356–61, 2004.

TESSIER-LAVIGNE, M.; GOODMAN, C. The molecular biology of axon guidance. **Science**, v. 274, p. 1123 – 1133, 1996.

TO, K. C. W.; CHURCH, J.; O'CONNOR, T. P. Combined activation of calpain and calcineurin during ligand-induced growth cone collapse. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 425–34, 2007.

TRENTIN, J.A.M. **Produção de domínios recombinantes de Semaforina5B e identificação de seus ligantes**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008

WINBERG, M. L.; NOORDERMEER, J. N.; TAMAGNONE, L.; et al. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 903–916, 1998.

WIT, J. DE; VERHAAGEN, J. Role of semaphorins in the adult nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 71, n. 2-3, p. 249–67, 2003.

WOODHOUSE, E. C.; FISHER, A.; BUNDLE, R. W.; et al. Drosophila screening model for metastasis: Semaphorin 5c is required for l(2)gl cancer phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11463–11468, 2003. National Academy of Sciences.

WOODS, R. A.; GIETZ, R. D. High-Efficiency Transformation of Plasmid DNA into Yeast. In: MACDONALD, P. N. **Methods in Molecular Biology – Two-hybrid systems: methods and protocols**. v. 177. Humana Press: New Jersey, 2001.
WOODS, R. A.; GIETZ, R. D. Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. In: Wai Xiao. **Methods in Molecular Biology – Yeast protocol**. v. 313. Springer Protocols, 2005.

ZANATA, S. M.; HOVATTA, I.; ROHM, B.; PÜSCHEL, A. W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 471–7, 2002.